



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Tatiana Lúcia Santos Nogueira

**Ancestralidade genômica matrilinear de indivíduos das regiões
Centro-Oeste, Norte e Nordeste do Brasil**

Rio de Janeiro
2019

Tatiana Lúcia Santos Nogueira

**Ancestralidade genômica matrilinear de indivíduos das regiões Centro-Oeste,
Norte e Nordeste do Brasil**

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Elizeu Fagundes Carvalho
Coorientadora: Prof.^a Dra. Dayse Aparecida Silva

Rio de Janeiro
2019

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

N778 Nogueira, Tatiana Lúcia Santos.

Ancestralidade genômica matrilinear de indivíduos das regiões Centro-Oeste, Norte e Nordeste do Brasil / Tatiana Lúcia Santos Nogueira. – 2019.
119 f.

Orientador: Prof. Dr. Elizeu Fagundes Carvalho
Coorientadora: Prof.^a Dra. Dayse Aparecida Silva

Tese (Doutorado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Bociências.

1. Genética da população humana – Teses. 2. DNA mitocondrial - Teses. 3. Genética forense. 4. Genoma humano. 5. Brasil - Etiologia - Teses. 6. Brasil – População - Teses. I. Carvalho, Elizeu Fagundes. II. Silva, Dayse Aparecida. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 575.1

Bibliotecária: Thais Ferreira Vieira _ CRB7/5302

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Tatiana Lúcia Santos Nogueira

**Ancestralidade genômica matrilinear de indivíduos das regiões Centro-Oeste,
Norte e Nordeste do Brasil**

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 27 de fevereiro de 2019.

Orientador: Prof. Dr. Elizeu Fagundes de Carvalho

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Dayse Aparecida Silva (Coorientadora)

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof.^a Dr.^a. Márcia Mattos Gonçalves Pimentel

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof. Dr. Luiz Antonio Ferreira da Silva

Universidade Federal do Alagoas

Prof. Dr. Marcos Dornelas Ribeiro

Instituto de Biologia do Exército

Rio de Janeiro

2019

DEDICATÓRIA

Dedico à minha família, minha mãe Zenith, meu pai Jorge, meu marido Júlio, meu filho Caio e minha sogra Rita, sem os quais minha vida não teria sentido.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tornar possível a realização desse objetivo.

A minha família, que sempre me apoia incondicionalmente em todos os meus projetos de vida.

Ao meu marido Júlio e ao meu filho Caio os quais privei da minha companhia em prol do trabalho e dos estudos, mas que sempre estiveram presentes, me apoiando em todos os momentos. Amo vocês profundamente!

Ao meu orientador Prof. Elizeu Fagundes de Carvalho, que me recebeu e aceitou me orientar. Sou grata pela oportunidade e pelo período de aprendizado.

A Prof.^a Dayse, minha Coorientadora, agradeço pela parceria, pelo apoio e compreensão em todos os momentos que precisei estar ausente por causa do meu trabalho e pelo intenso aprendizado que me proporcionou nas mais diversas atividades que desenvolvi, como parte da formação durante o doutoramento.

Ao Prof. Luiz Antônio Ferreira da Silva, que me iniciou na área da genética forense, me recebeu em seu laboratório sem nenhuma indicação prévia ou referência ao meu respeito, que sempre me incentivou a evoluir, a não desistir do doutorado e que sempre me socorreu, mesmo à distância, quando eu enfrentava dificuldades nas atividades técnicas na Seção de Genética do IBEx. Minha admiração e eterna gratidão.

Aos meus colegas de trabalho do Instituto de Biologia do Exército, Maj Dornelas, meu chefe direto e amigo, pelo apoio na conclusão deste trabalho e aos amigos da Divisão de Ensino e Pesquisa, pelas discussões científicas e por todo apoio e compreensão na condução dos trabalhos da Divisão onde precisei me ausentar e me dividir por várias vezes durante esse período.

A minha querida amiga e colega de trabalho Olívia (Livinha), que mais uma vez me apoiou, sem medir esforços, na condução das tarefas na Seção de Genética do IBEx para que eu pudesse desenvolver a pesquisa durante esse longo período de formação e também pela ajuda em experimentos e seleção das amostras do RAEx aqui estudadas. Obrigada por sua amizade e dedicação de sempre.

Ao ex-diretor do IBEx, Cel Farm Lúcio Aparecido Luiz, que me incentivou e sempre me apoiou a desenvolver o presente estudo e que sempre proporcionou as condições possíveis para que a Seção de Genética pudesse ser desenvolvida.

A minha amiga e parceira profissional Ludmila (Lud), que inúmeras vezes me auxiliou, tanto na parte experimental, quanto na parte acadêmica (inclusive nos finais de semana), que sempre me apoiou em todos os momentos deste estudo. Obrigada por sua amizade, por sempre ter estado presente, pelo apoio emocional e também pelo contínuo aprendizado.

A Mayara e a Anna Beatriz, que também me ajudaram imensamente na bancada com o grande volume de análises que demandaram este trabalho e pelo grande aprendizado que me proporcionaram quando tive a oportunidade de ser orientadora e revisora dos seus respectivos Trabalhos de Conclusão de Curso na graduação. Sou muito grata pela amizade e por todo apoio.

Aos colegas do Laboratório de Diagnósticos por DNA (LDD/UERJ), que de alguma forma me ajudaram a concluir este trabalho. Muito obrigada!

A América é o vastíssimo cadinho em que se fundem hoje as diversas raças e gentes do globo. Porventura sua missão histórica de dar, servindo de campo para o cruzamento de todas elas, unidade étnica á humanidade, e, portanto, nova face ás sociedades que hão de viver no futuro... O Brazil vae pela mesma estrada, e aqui, como em todo continente, os povos e as raças mesclam-se, fazendo desaparecer completamente os typos puros, tornando-se n'esta parte do mundo, mais do que em nenhuma outra, verdadeiro o princípio da antropologia que nega a existência de raças puras.

José Verissimo.

RESUMO

NOGUEIRA, Tatiana Lúcia Santos. *Ancestralidade genômica matrilinear de indivíduos das regiões Centro-Oeste, Norte e Nordeste do Brasil*. 2019. 119 f. Tese (Doutorado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

As características étnicas da população brasileira refletem cinco séculos de história que marcam o processo de povoamento durante o período colonial, o qual envolveu a interrelação de nativos indígenas, colonizadores europeus e escravos africanos. O objetivo deste estudo foi caracterizar as linhagens maternas dos complexos regionais do Centro-Oeste, do Norte e do Nordeste do país com base na análise completa da região controle do DNA mitocondrial. Foram incluídas amostras de 413 indivíduos não relacionados, nascidos nos quatro Estados da região Centro-Oeste, em seis Estados da região Norte e em sete da região Nordeste. Nas análises de diversidade genética em nível intrapopulacional foram encontrados 149 haplótipos diferentes na região Centro-Oeste, 141 na região Norte e 93 na região Nordeste num total de 159, 154 e 100 haplótipos de cada região, respectivamente. Uma alta diversidade haplotípica foi observada na região Centro-Oeste ($0,9990 \pm 0,0009$) e nas regiões Norte e Nordeste os índices se mostraram proporcionalmente semelhantes ($0,9985 \pm 0,0010$ e $0,9984 \pm 0,0018$). As proporções relativas das linhagens maternas com base na determinação dos haplogrupos foi de 62,99% de ameríndios, 32,47% de africanos e 4,54% de europeus na região Norte; 47,17% de ameríndios, 32,85% de africanos e 16,98% de europeus na região Centro-Oeste e; 39% de ameríndios, 44% de africanos e 17% de europeus na região Nordeste. Estes dados estão alinhados com o contexto histórico da colonização do Brasil e de como se deu o processo de povoamento ao longo de cinco séculos. Distâncias genéticas significativas foram observadas entre a região Nordeste e as regiões Centro-Oeste e Norte, bem como com as populações da região Sudeste. A população de Santa Catarina apresentou alto índice de diversidade nas comparações com todas as populações analisadas, em consonância com as influências migratórias de europeus que marcaram a região Sul do país na época da colonização. Uma base de dados de 383 haplótipos foi construída para as regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste do Brasil o que poderá contribuir para a expansão de dados já existentes das linhagens mitocondriais de povos da América do Sul.

Palavras-chave: DNA mitocondrial. População brasileira. Genética populacional. Região Centro-Oeste. Região Norte. Região Nordeste.

ABSTRACT

NOGUEIRA, Tatiana Lucia Santos. *Matrilineal genomic ancestry of individuals from Midwest, North and Northeast of Brazil*. 2019. 119 f. Tese (Doutorado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

The ethnic characteristics of the Brazilian population reflect four centuries of history that marked the process of settlement during the colonial period, which involved the interrelationship of indigenous natives, European colonizers and African slaves. The objective of this study was to characterize the maternal lineages of the regional complexes of the Midwest, North and Northeast of the country based on the complete analysis of the mitochondrial DNA control region. Samples from 413 individuals unrelated were included, predominantly male gender, born in the four states of Midwest, in the six states of North and in seven states of Northeast region. The genetic diversity analyzes at intrapopulation level showed 149 different haplotypes in the Midwest region, 141 in the North region and 93 in the Northeast region, in a total of 159, 154 and 100 haplotypes from each region, respectively. A high haplotype diversity was observed in the Midwest region (0.9990 ± 0.0009) and in the North and Northwest regions the indexes were proportionally similar (0.9985 ± 0.0010 e 0.9984 ± 0.0018). The relatively proportions of the maternal lineages based in the haplogroups determination was 62.99% of Amerindian, 32.47% of African and 4.54% of European in the North region; 47.17% of Amerindian, 32.85% of African and 16.98% of European in the Midwest region and; 39% of Amerindian, 44% of African and 17% of European in the Northeast region. These data are in concordance with the historical context of Brazil's colonization and with how the settlement process occurred within the past five centuries. Significant genetic differentiation was observed between the Northeast region and both the Midwest and North regions, as well as with the Southeast region population. The population from Santa Catarina presented a high differentiation index in the comparison with all populations analyzed, in consonance with the migratory influences of Europeans that marked the southern region of the country at the time of the settlement process. A database of 383 haplotypes was created for the North, Northeast and Central West regions of Brazil, which may contribute to the expansion of already existing data of the mitochondrial lineages of South American peoples.

Keywords: Mitochondrial DNA. Brazilian population. Populational Genetics. Midwest Region. North Region. Northeast Region.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Representação esquemática da estrutura da mitocôndria	22
Figura 2 –	Representação esquemática do modelo de transmissão do DNAMt na linhagem germinativa feminina	23
Figura 3 –	Representação esquemática do genoma mitocondrial humano	26
Figura 4 –	Região controle do DNAMt humano e os eventos de replicação e término da transcrição	28
Figura 5 –	Eletroferograma de sequências ancestral e mutada da posição 16189 da região controle do DNAMt	34
Figura 6 –	Representação esquemática da sequência referência de Cambridge do DNAMt entre as posições 303 e 315	35
Figura 7 –	Eletroferograma com inserção de citosinas à montante e à jusante da posição 310 da região controle do DNAMt	35
Figura 8 –	Representação esquemática da inserção de dinucleotídeos AC na posição 524 da região controle do DNAMt	36
Figura 9 –	Homopolímero C entre as posições 568 e 573 na região HVIII do DNAMt	37
Figura 10 –	Filogenia do DNAMt com os respectivos haplogrupos	39
Figura 11 –	Mapa mundial representativo das migrações populacionais e distribuição geográfica dos respectivos haplogrupos principais do DNAMt	41
Figura 12 –	Mapa da distribuição geográfica das amostras analisadas	53
Figura 13 –	Desenho experimental	54
Figura 14 –	Estratégia de amplificação e sequenciamento da região controle do DNAMt	57

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Registro numérico das populações indígenas no Brasil de 1500 a 2010	43
Gráfico 2 – Distribuição das frequências das linhagens ameríndia, africana e europeia das três regiões do Brasil (Centro-Oeste, Norte e Nordeste) baseada na análise da região controle do DNAm	65
Gráfico 3 – Distribuição das frequências dos haplogrupos do DNAm da região Centro-Oeste	69
Gráfico 4 – Distribuição das frequências dos haplogrupos do DNAm da região Norte	71
Gráfico 5 – Distribuição das frequências dos haplogrupos do DNAm da região Nordeste	73
Gráfico 6 – Plotagem MDS das distâncias genéticas (F_{ST}) entre as cinco regiões do Brasil baseada nas diferenciações de haplótipos da região controle do DNAm	78

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Distribuição das amostras das regiões Centro-Oeste, Norte e Nordeste do Brasil	52
Quadro 2 – Distribuição dos haplogrupos principais por região geográfica (Centro-Oeste, Norte e Nordeste) do Brasil	66
Quadro 3 – Variações nucleotídicas da região controle do DNAm _t de indivíduos das regiões Centro-Oeste, Norte e Nordeste do Brasil, destacadas pela ferramenta “ <i>EMPCheck</i> ”	76
Quadro 4 – Frequências dos sub-haplogrupos de linhagem africana nas regiões Centro-Oeste, Norte e Nordeste do país, Rio de Janeiro, Alagoas, Pará, Maranhão e Amapá, de grupos linguísticos Bantu do Sudeste da África, Angola e EUA	84
Quadro 5 – Frequências dos haplogrupos e sub-haplogrupos de linhagem ameríndia nas regiões Centro-Oeste, Norte e Nordeste do país e dos Estados do Rio de Janeiro, Santa Catarina, Alagoas e Pará	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Convenção da IUPAC para nomenclatura de nucleotídeos	33
Tabela 2 –	Protocolo de amplificação direta	56
Tabela 3 –	Protocolo de amplificação convencional	58
Tabela 4 –	Oligonucleotídeos utilizados na reação de sequenciamento	60
Tabela 5 –	Protocolo da reação de sequenciamento	60
Tabela 6 –	Frequência de heteroplasmia de comprimento por região geográfica	64
Tabela 7 –	Índices de diversidade molecular baseados nas sequências da região controle do DNAm _t	75
Tabela 8 –	Frequências absolutas das variantes polimórficas da região controle do DNAm _t encontradas nas regiões Centro-Oeste, Norte e Nordeste do Brasil	76
Tabela 9 –	Matriz de distâncias genéticas entre as populações	77
Tabela 10 -	Frequências de haplogrupos em diferentes estudos da região Norte do Brasil	80
Tabela 11 -	Frequências de haplogrupos em diferentes estudos da região Nordeste do Brasil	82

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP	Adenosina Trifosfato
BDT RR	<i>Big Dye Terminator Ready Reaction</i>
COX	Citocromo C Oxidase
D-Loop	<i>Displacement Loop</i>
DNAmt	DNA mitocondrial
DNA _n	DNA nuclear
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Trifosfatados
ETC	<i>Eletron Transport Chain</i> (Cadeia de Transporte de Elétrons)
FTA	<i>Flinders Technology Associates</i>
HAM	Homem Anatomicamente Moderno
HC	Heteroplasmia de Comprimento
HG	Haplogrupo
HP	Heteroplasmia de Ponto
HSP1	<i>Heavy Strand Promoter 1</i> (Promotor da Cadeia Pesada 1)
HSP2	<i>Heavy Strand Promoter 2</i> (Promotor da Cadeia Pesada 2)
HVI	<i>Hypervariable region I</i> (Região Hipervariável I)
HVII	<i>Hypervariable region II</i> (Região Hipervariável II)
HVIII	<i>Hypervariable region III</i> (Região Hipervariável III)
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ISFG	<i>International Society for Forensic Genetics</i>
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
LSP	<i>Light Strand Promoter</i> (Promotor da Cadeia Leve)
MDS	<i>Multidimensional Scalling</i> (Escalonamento Multidimensional)
MgCl	Cloreto de Magnésio
MINUSTAH	<i>Mission des Nations Unies pour la Stabilisation en Haïti</i> (Missão das Nações Unidas para a Estabilização do Haiti)
mM	Milimolar
MRCA	<i>Most Recent Common Ancestor</i> (Ancestral Comum Mais Recente)
mRNA	RNA mensageiro
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase)

rCRS	<i>Revised Cambridge Reference Sequence</i> (Sequência Referência de Cambridge Revisada)
RAEx	Repositório de Amostras do Exército Brasileiro
RNA	Ácido Ribonucleico
rRNA	RNA ribossomal
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i> (Polimorfismo de Nucleotídeo Único)
STR	<i>Short Tandem Repeat</i> (Repetição Curta em Tandem)
SWGAM	<i>Scientific Working Group on DNA Analysis Methods</i>
tRNA	RNA transportador
μL	Microlitro
μM	Micromolar

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	17
1	REVISÃO DA LITERATURA	21
1.1	A mitocôndria	21
1.2	O genoma mitocondrial	25
1.3	Fenômenos heteroplásmicos e sua aplicação na área forense	28
1.3.1	<u>Heteroplasmias de ponto</u>	29
1.3.2	<u>Heteroplasmias de comprimento</u>	30
1.3.3	<u>Nomenclatura das Heteroplasmias</u>	32
1.4	Haplogrupos mitocondriais e as migrações humanas	37
1.5	A colonização do Brasil e sua influência na formação da população brasileira	41
1.5.1	<u>Os ameríndios</u>	42
1.5.2	<u>A influência africana</u>	44
1.5.3	<u>A migração europeia</u>	44
1.6	Importância da construção de banco de dados genético para fins de identificação humana	46
1.6.1	<u>No âmbito civil</u>	46
1.6.2	<u>No âmbito militar</u>	47
2	OBJETIVOS	50
2.1	Objetivo geral	50
2.2	Objetivos específicos	50
3	MATERIAL E MÉTODOS	51
3.1	População, seleção das amostras para o estudo e aspectos éticos .	51
3.2	Descrição do método	54
3.2.1	<u>Amostras com menos de dois anos de armazenamento</u>	55
3.2.2	<u>Amostras com mais de dois anos de armazenamento</u>	57
3.2.3	<u>Purificação dos produtos amplificados</u>	59
3.2.4	<u>Reação de sequenciamento e purificação dos produtos de extensão</u>	59
3.2.5	<u>Eletroforese capilar</u>	61
3.2.6	<u>Análise das sequências com base nas ferramentas computacionais</u>	61

3.2.7	<u>Cálculos dos índices de diversidade genética</u>	62
4	RESULTADOS	63
4.1	Caracterização das sequências mitocondriais	63
4.2	Classificação e frequência dos haplogrupos	64
4.2.1	<u>Região Centro-Oeste</u>	65
4.2.2	<u>Região Norte</u>	70
4.2.3	<u>Região Nordeste</u>	72
4.3	Diversidade genética	74
4.3.1	<u>Análises em nível intrapopulacional</u>	74
4.3.2	<u>Análises em nível interpopulacional</u>	76
5	DISCUSSÃO	79
	CONCLUSÃO	89
	REFERÊNCIAS	91
	APÊNDICE A - Região controle do DNAm	100
	APÊNDICE B - Mitochondrial DNA direct PCR sequencing of bood FTA paper (artigo publicado)	101
	APÊNDICE C - MTDNA CONTROL REGION ANALYSIS OF North Brazilian population (Artigo publicado)	104
	ANEXO A – Lista de haplótipos da região Centro-Oeste.....	106
	ANEXO B – Lista de haplótipos da região Norte	109
	ANEXO C – Lista de haplótipos da região Nordeste	112
	ANEXO D – Aprovação do CEP-HUPE/UERJ	115
	ANEXO E – Termo de Consentimento de Uso de Dados (TCUD)	117
	ANEXO F – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)	118

INTRODUÇÃO

O genoma mitocondrial dos mamíferos se caracteriza por uma molécula circular dupla fita, sendo constituído por 16.659 nucleotídeos, 37 genes e uma região controle contendo três sequências polimórficas denominadas de HVI, HVII e HVIII (Anderson *et al.*, 1981; Andrew *et al.*, 2011; Van Oven e Kayser, 2008). Em comparação com o genoma nuclear, o DNA mitocondrial (DNAMt) apresenta-se em elevado número de cópias por célula, não estando sujeito à recombinação e constitui uma herança exclusivamente materna. Cada célula somática pode conter um número variável de cópias de DNAMt, de acordo com o tipo de tecido, de cerca de 200 a 100.000 cópias. Geralmente, todas as cópias de DNAMt no interior da célula são idênticas entre si, condição denominada de homoplasmia. Entretanto, cópias diferentes de DNAMt podem coexistir em variadas proporções entre as células de um mesmo tecido, entre diferentes órgãos de um mesmo indivíduo ou entre indivíduos de uma mesma família. Tal característica é chamada de heteroplasmia (DiMauro e Schon, 2001; Taylor e Turnbull, 2005; Berger *et al.*, 2011; Chinnery e Hudson, 2013; Ramos *et al.*, 2013; Just *et al.*, 2015; Stewart e Chinnery, 2015; Yusoff *et al.*, 2015).

Por ser um genoma que possui uma taxa de mutação significativamente superior à do DNA nuclear (DNAn), o que gera uma alta variabilidade populacional, eventos evolutivos recentes podem ser melhor estudados pela análise do DNAMt em comparação com a variação observada a partir do DNA nuclear (Ramos *et al.*, 2013; Chinnery e Hudson, 2013). Neste contexto, as variantes nucleotídicas herdadas ao longo da história humana foram subdivididas em grupos principais denominados haplogrupos que, por sua vez, constituem conjuntos similares de haplótipos que compartilham vários polimorfismos (Chinnery e Hudson, 2013; Stewart e Chinnery, 2015). A maioria destas subdivisões ocorreram há mais de 10.000 anos, como consequência das migrações humanas em novas áreas geográficas (Chinnery e Hudson, 2013). Desta forma, a alta taxa de mutação do DNAMt, possibilita a sua utilização para traçar linhagens matrilineares através das gerações (Giles *et al.*, 1980; Ramos *et al.*, 2013), constituindo-se a sua análise por sequenciamento uma eficiente metodologia largamente utilizada para a obtenção de informações sobre a

origem geográfica de indivíduos, bem como da história evolutiva humana (Ballantyne *et al.*, 2012; Cardena *et al.*, 2013).

No contexto forense, a análise do DNAMt configura-se como uma metodologia de grande valia quando da ocorrência, em uma evidência biológica, de DNAMt altamente degradado ou em diminutas quantidades (Parson *et al.*, 1998; Wurmb-Schwark, *et al.*, 2007). Em função disso, a obtenção e o armazenamento de perfis genéticos mitocondriais (Bancos de Dados de DNAMt) podem agregar informações importantes com diversas aplicações na identificação humana e de outras espécies.

Dados relativos ao DNAMt da população brasileira ainda não foram extensivamente explorados. Tal situação traz limitações para as análises forenses especialmente quando as frequências haplotípicas necessitam ser estimadas, o que hoje ocorre por meio de pesquisa em bancos de dados mundiais (Prieto *et al.*, 2011). Ademais, a maioria dos estudos já realizados no Brasil foram baseados na análise das regiões HVI e HVII, como por exemplo, os estudos de Barbosa e colaboradores (2008) da população de Alagoas. Em outro estudo com a população do Rio Grande do Sul (Marrero *et al.*, 2007) foi analisada apenas a região HVI, sendo que poucos estudos envolveram a análise de toda a região controle como em populações de Ameríndios (Silva Jr. *et al.*, 2002; Ramallo *et al.*, 2013), Santa Catarina (Palencia *et al.*, 2010), São Paulo (Prieto *et al.*, 2011), Espírito Santo (Sanches *et al.*, 2014) e Rio de Janeiro (Bernardo *et al.*, 2014; Simão *et al.*, 2018).

Justificativa e Relevância do Estudo

De acordo com os registros históricos a população nativa do Brasil era composta de Nativos Americanos até a chegada dos colonizadores europeus da península Ibérica nos anos de 1500 (Homburguer *et al.*, 2015). A partir daí, houve uma crescente “miscigenação” com os colonizadores e nativos da África, trazidos aos milhares para o Brasil como escravos, sendo esses três componentes étnicos, até onde podemos inferir pelos registros históricos, os norteadores da ascendência genômica brasileira, refletindo o caráter miscigenado da população.

Através das linhagens identificadas de DNA mitocondrial, marcador de linhagem matrilinear, pretende-se caracterizar melhor essa história pelo lado materno, bem como, as relações interpopulacionais das regiões brasileiras, com foco nas suas características particulares de povoamento, comparando com os registros históricos e dados interdisciplinares disponíveis.

Nosso interesse neste contexto é traçar o componente ancestral matrilinear dos grupos humanos que formam as populações das regiões brasileiras, principalmente para as regiões Centro-Oeste, Norte e Nordeste, para as quais, poucos ou nenhum dado estão ainda disponíveis para esse marcador genético. Para isso, perguntamos: i) qual será a contribuição das linhagens maternas ancestrais para cada uma dessas regiões que tiveram histórias de povoamento diferenciadas em função das características continentais do Brasil?; ii) quais as relações interpopulacionais entre habitantes das regiões Centro-Oeste e Norte do Brasil, reconhecidamente regiões com marcada herança nativa americana em comparação com as demais regiões do Brasil?

Portanto, o presente trabalho traz a perspectiva de contribuir para uma melhor compreensão das questões históricas que se relacionam com os processos de colonização e migração populacional no Brasil.

A motivação para o desenvolvimento deste estudo nasceu da necessidade, por parte do Exército Brasileiro, de construir uma base de dados exclusivamente de militares. Desde o ano de 2004 o Brasil vem participando de forma mais ativa em missões operacionais da Organização das Nações Unidas em outros países. A partir de então, foi primordial a concentração de esforços no sentido de implantar meios de gerenciamento e controle do seu efetivo empregado em tais missões, incluindo a criação de um repositório de amostras biológicas para fins de identificação humana. O RAEx, Repositório de Amostras do Exército Brasileiro, localizado no Estado do Rio de Janeiro, iniciou suas atividades em 2005, com o envio de tropas brasileiras para a missão de paz no Haiti. Os militares que integram estas missões têm suas amostras de sangue coletadas em papel de filtro tratado (FTA *Classic Card* – Whatman/GE) e as mesmas são armazenadas no RAEx a partir do momento que estes militares embarcam para as missões e lá permanecem durante todo o seu tempo de serviço ativo, que é de no máximo 30 anos. Atualmente, o repositório possui em torno de 30 mil amostras armazenadas sob controle de temperatura e umidade e com gerenciamento informatizado.

A escolha da população militar como casuística do presente estudo foi também pautada no fato de que o efetivo das Forças Armadas tem ampla representatividade da população brasileira, tendo em vista que sua composição é feita, em maior número, por jovens que prestam o serviço militar obrigatório, oriundos das mais diversas classes sociais e econômicas e de variados padrões culturais do nosso país. Além disso, todos os Estados da federação estão presentes no RAEx como referência de nascimento dos militares cadastrados.

Sendo assim, além de suprir a necessidade das Forças Armadas com relação à identificação genética do seu pessoal, o trabalho em pauta gera dados úteis também a população civil por se tratar de informações características da população brasileira.

Por fim, com o estudo das linhagens mitocondriais identificadas, temos a perspectiva de contribuir para a expansão das bases de dados que integram os bancos populacionais endereçados à identificação civil e forense.

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 A mitocôndria

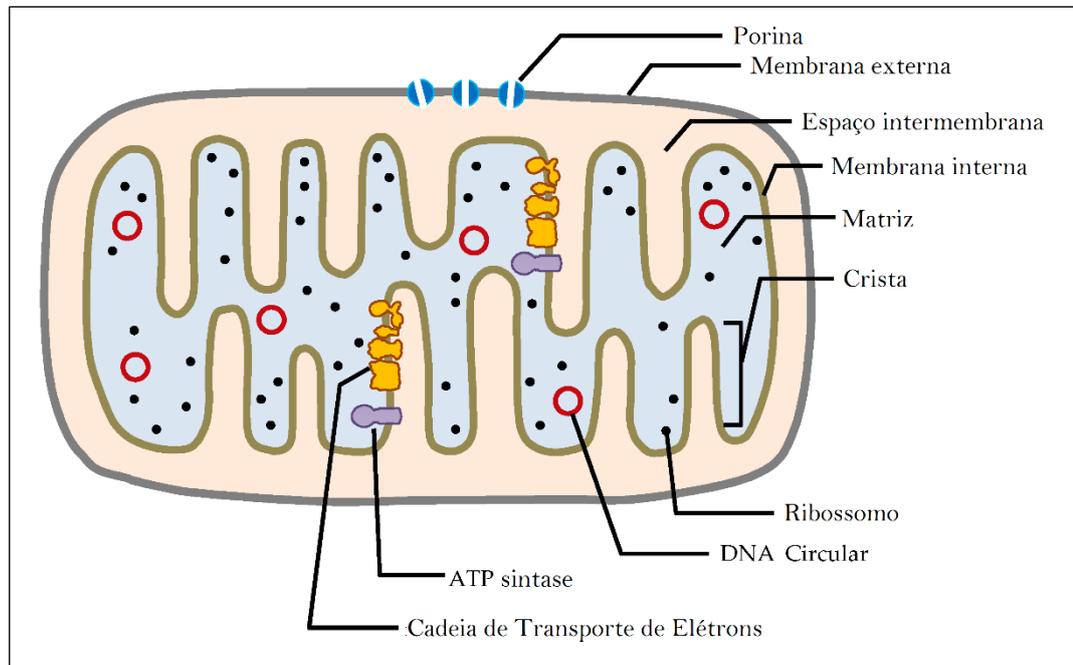
A mitocôndria da maioria dos eucariotos constitui uma organela altamente especializada, responsável pelo metabolismo energético da célula, por meio da fosforilação oxidativa. Além disso, a mitocôndria também desempenha um papel de extrema importância em outros processos biológicos do organismo, tais como, a sinalização de cálcio celular, regulação do metabolismo da célula, síntese do heme, síntese de esteroides e apoptose (Chinnery e Hudson, 2013; Yusoff *et al.*, 2015).

A origem da mitocôndria é compreendida como uma relação simbiótica por meio da associação entre uma célula procariótica e uma proteobactéria primitiva ocorrida há cerca de dois bilhões de anos atrás (Stewart e Chinnery, 2015). Após o processo de endocitose por outras células, a proteobactéria se transformou em uma organela citoplasmática de dupla membrana e, aos poucos, foi passando seu material genético para o que antes era o núcleo das células procarióticas. Durante milhões de anos, este processo foi reduzindo o tamanho do genoma intraorganelar, consolidando em definitivo a relação simbiótica entre a organela que, posteriormente, se transformou em mitocôndria, e o núcleo das células eucarióticas (Taanman, 1999; Stewart e Chinnery, 2015).

Com relação à sua estrutura, a mitocôndria possui dupla membrana, cuja membrana externa separa a mitocôndria do citosol e a membrana interna apresenta invaginações que formam as cristas mitocondriais, onde se localizam as moléculas do DNAm (Figura 1) (Taanman, 1999). O espaço entre as membranas interna e externa é denominado espaço intermembrana, local onde também se encontra a matriz (parte interior da mitocôndria, próxima à membrana interna) (Yusoff *et al.*, 2015). Proteína e lipídio, na proporção de 50:50, compõem a membrana externa da bicamada lipídica. Já a membrana interna é composta por cerca de 70% de proteínas e é impermeável à maioria das moléculas e prótons e constitui o sítio da cadeia de transporte de elétrons (ETC – *Eletron Transport Chain*). Na matriz mitocondrial encontram-se diversas enzimas, proteínas e peptídeos, assim como a

DNA polimerase, chaperonas, ribossomos, RNAs mensageiros e transportadores e o DNAMt (Yusoff *et al.*, 2015).

Figura 1 – Representação esquemática da estrutura da mitocôndria



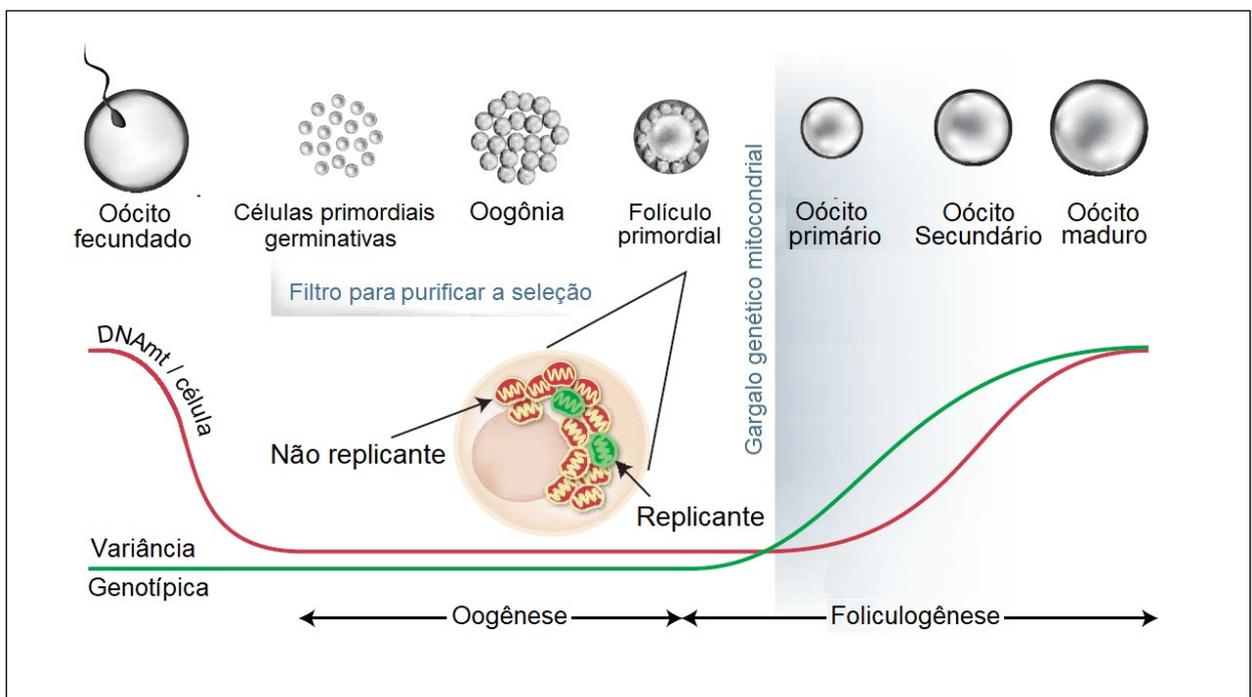
Fonte: adaptada de YUSOFF *et al.*, 2015.

O fluxo de informações genéticas do genoma mitocondrial difere da genética mendeliana clássica em três aspectos principais: herança materna, segregação mitótica e a ocorrência de heteroplasmia (Dimauro e Schon, 2001). O fato de o DNAMt seguir o padrão de herança não-mendeliano significa que a informação genética é herdada independentemente dos genes nucleares, ou seja, não há segregação por meio dos fusos meiótico e mitótico para distribuição de cópias para os gametas ou para as células filhas (Lewin, 2009). Em relação à herança uniparental, a teoria mais aceita atualmente para a ausência do DNAMt proveniente da linhagem paterna é a de que este é eliminado por ubiquitinação seletiva durante o processo de formação do zigoto (Chinnery e Hudson, 2013). Entretanto, há outras duas teorias propostas para este fato: o efeito diluição, tendo em vista que as mitocôndrias da célula germinativa masculina possuem um número muito reduzido

de cópias de DNAm_t (apenas 100 cópias comparado com 100 mil cópias no óvulo não fecundado) e o gargalo genético mitocondrial (Dimauro e Schon, 2001; Sutovsky, 2003; Taylor e Turnbull, 2005; Chinnery e Hudson, 2013; Stewart e Chinnery, 2015).

Sobre o mecanismo proposto para explicar o fenômeno do gargalo genético mitocondrial, após a fecundação, durante a embriogênese, há uma redução significativa do número de cópias do DNAm_t, onde as células germinativas primordiais, possuem um número reduzido de cópias de DNAm_t, em torno de 200 mil (Sun e John, 2016). À medida que as células passam pelo processo de maturação, durante a oogênese, até os oócitos fertilizáveis (fase da foliculogênese), o número de cópias do DNAm_t sofre um grande aumento, a cerca de 180.000 cópias por célula (Figura 2) (Taylor e Turnbull, 2005; Sun e John, 2016).

Figura 2 – Representação esquemática do modelo de transmissão do DNAm_t na linhagem germinativa feminina



Fonte: adaptada de WAI e colaboradores, 2008.

Estudos anteriores (Upholt e Dawid, 1977; Olivo *et al.*, 1983), tendo como modelos espécies de ovinos e caprinos e espécies de bovinos, respectivamente, serviram de pilares para postular a hipótese do gargalo genético mitocondrial. A partir de então, foram desenvolvidos diversos estudos, especialmente os voltados para a elucidação de mutações patogênicas/deletérias no DNAm frente às manifestações de doenças (Wai, Teoli e Schoubridge, 2008; Stewart e Chinnery, 2015; Chinnery e Hudson, 2013; Sun e John, 2016; Kasashima, Nagao e Endo, 2014; Wilson *et al.*, 2016; Yusoff *et al.*, 2015). Desta forma, foi admitido que, o gargalo genético mitocondrial é mais provável de ocorrer durante a foliologênese, devido à replicação de uma subpopulação de moléculas de DNAm (Kasashima, Nagao e Endo, 2014; Wai *et al.*, 2008, Stewart e Chinnery, 2015).

A distribuição de cópias mutantes e selvagens do DNAm para as células filhas durante a etapa da divisão celular ocorre de forma aleatória, fazendo com que essa proporção seja aumentada ou diminuída a cada geração subsequente da linhagem celular (Yusoff *et al.*, 2015). Desta forma, um número variável de tipos mutante e selvagem (heteroplasmia), em uma mesma célula ou entre diferentes tecidos, conforme já dito anteriormente, é consequência de um sistema de reparo ineficiente e também de um ambiente oxidativo localizado (Chinnery e Hudson, 2013).

Outra característica importante em relação à transmissão da informação é que o DNAm não sofre recombinação. Sua informação é passada às gerações em blocos denominados haplótipos. Tais blocos permanecem inalterados até que ocorra uma mutação (Lewin, 2009; Chinnery e Hudson, 2013).

As heteroplasmias têm papel importante tanto na área médica, quanto na área forense. Na área da genética médica, a variação na proporção de mutantes heteroplásmicas herdadas possui estrita relação com o desenvolvimento de doenças ligadas ao DNAm. Uma mutação patogênica no genoma mitocondrial do tipo heteroplásmica, quando expressa clinicamente, apresenta correlação direta com a proporção dos tipos selvagem e mutante existentes no interior da célula (Chinnery e Hudson, 2013). Sabe-se que aproximadamente 80 a 90% de mutantes representam o limiar típico, no caso de mutações pontuais, para a manifestação de doenças em nível celular, e o seu reflexo em nível tecidual se deve à gravidade do fenótipo clínico (Chinnery e Hudson, 2013).

Dada a importância da análise das heteroplasmias na área forense, especialmente com relação à possibilidade de determinar uma linhagem materna em particular, este tema será abordado de forma mais aprofundada posteriormente na seção 1.3.

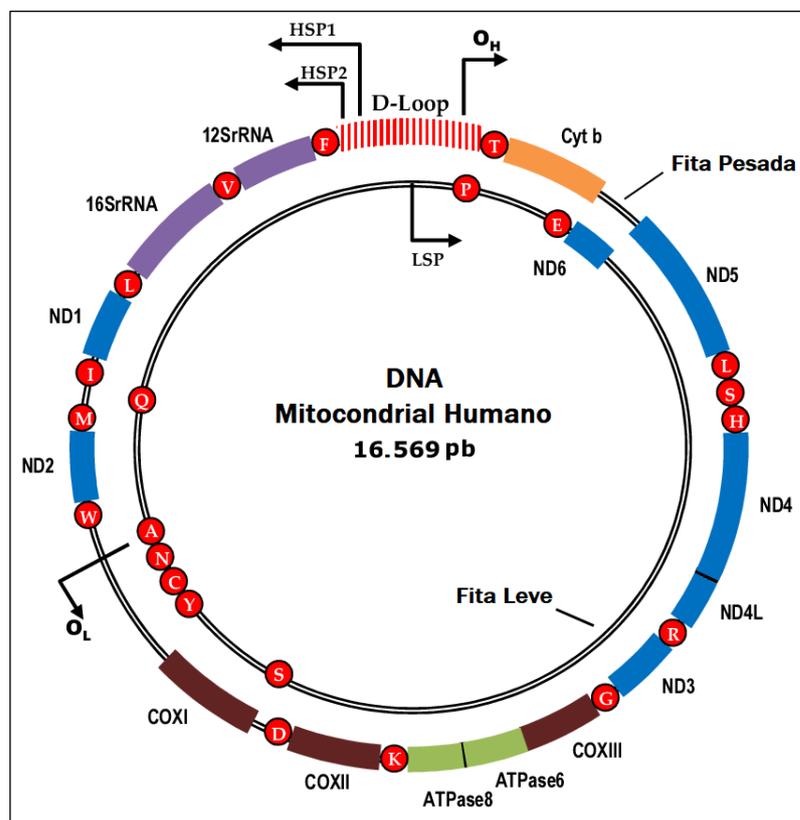
1.2 O genoma mitocondrial

Em 1981, foi pela primeira vez descrita a sequência do DNAm por Anderson e colaboradores, a qual é comumente referida como Sequência de Anderson ou Sequência de Referência de Cambridge (CRS – *Cambridge Reference Sequence*). Posteriormente, em 1999, a CRS foi reanalisada por Andrews e colaboradores, e incluiu 11 pequenas alterações na sequência original de Anderson. Desde então, todas as análises de linhagens mitocondriais são comparadas com a Sequência de Referência de Cambridge revisada (rCRS – *revised Cambridge Reference Sequence*) (Ballard, 2016). O DNAm se diferencia do genoma nuclear em diversos aspectos. Quanto a sua organização estrutural e gênica, caracteriza-se por ser um genoma relativamente pequeno, abundante e altamente conservado entre os mamíferos (Taanman, 1999). Trata-se de um genoma circular, dupla fita, onde cada fita se distingue entre si de acordo com sua composição de nucleotídeos: A fita pesada (cadeia externa), é rica em guanina em comparação com a fita leve (cadeia interna), a qual é rica em citosina (Figura 3). A molécula do genoma mitocondrial compreende 16.569 nucleotídeos a qual codifica 22 genes de RNA transportador (tRNA) e 2 de RNA ribossomal (rRNA) dispostos intercalados entre os genes que codificam as 13 subunidades peptídicas do complexo ETC (*Eletron Transfer Chain*) (Figura 1) (Stewart e Chinnery, 2015; Yusoff *et al.*, 2015; Sun e John, 2016).

Dos 37 genes codificantes, 28 encontram-se na fita pesada e nove na fita leve e são responsáveis pela síntese de sete subunidades do complexo I, o qual inclui as NADH desidrogenases 1 a 6 e 4L (MTND1-MTND6 e MTND4L), uma subunidade do complexo III (o citocromo B, CYTB), três subunidades do complexo III (as citocromo C oxidases COX I, II e III) e duas subunidades do complexo IV (as ATP sintases 6 e 8 – ATPase6 e ATPase 8) (Anderson *et al.*, 1981; Chinnery e Hudson, 2013; Yusoff *et al.*, 2015; Stewart e Chinnery, 2015; Sun e John, 2016). Outra diferença do

DNAmt em relação ao DNA nuclear (DNAn) está no códon de parada. Enquanto no DNAn são descritos três códons de terminação da síntese (UAA, UAG, UGA), no DNAmt existem apenas dois (AGA e AGG). Como compensação, o códon UAA, que não é codificado em alguns genes mitocondriais, é adicionado em nível pós-transcricional pelo mecanismo da cauda poli-A. Ou seja, uma transcrição inicial normalmente terminada com U ou UA, que pode sofrer adenilação, tendo adeninas adicionadas no final destes transcritos para formar um códon de parada UAA (Anderson *et al.*, 1981; Chinnery e Hudson, 2013; Sun e John, 2016).

Figura 3 – Representação esquemática do genoma mitocondrial humano



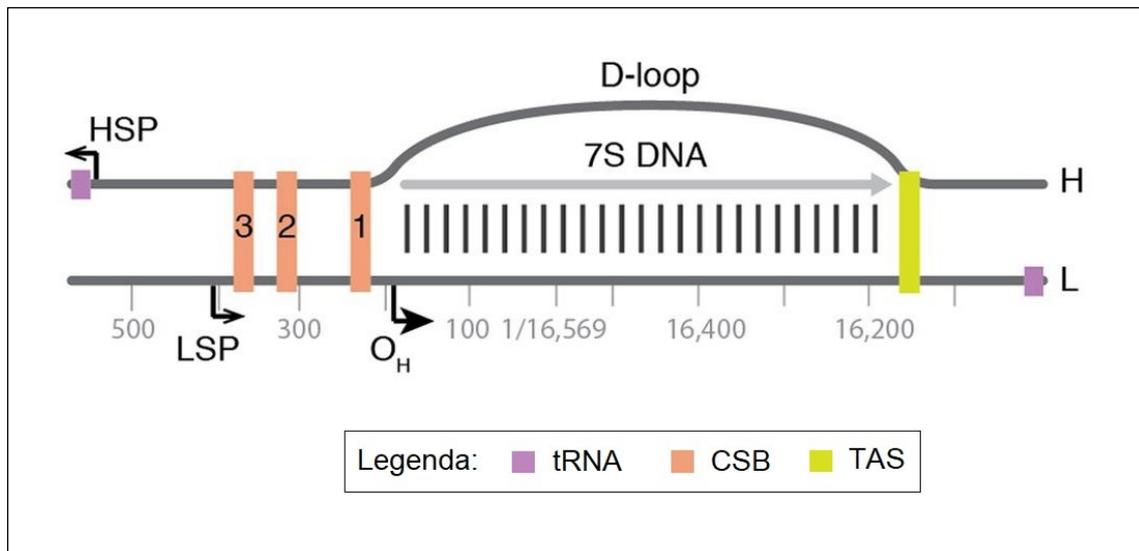
Legenda: Y, Tirosina; S, Serina; D, ácido aspártico; K, Lisina; G, Glicina; R, Arginina; H, Histidina; E, ácido glutâmico; T, Treonina; P, Prolina. O genoma é altamente organizado e mostra pouca redundância de sua sequência de codificação. A região controle (D-Loop) não codificante contém os promotores para a transcrição das cadeias leve (LSP) e pesada (HSP1 e HS2) e a origem da replicação da cadeia pesada (OH). A origem da replicação da cadeia leve é mostrada como OL.

Fonte: adaptada de YUSOFF e colaboradores, 2015.

Uma única região não codificante, presente no DNAm, também denominada como região controle, D-Loop (*displacement loop*), representa pouco menos de 10% de todo genoma mitocondrial (Andrew *et al.*, 2011; Ramos *et al.*, 2013) e possui três regiões hipervariáveis, à saber: HVI (16024–16365), HVII (73–340) e HVIII (438–574), num total de 1.121 nucleotídeos, considerando todo o segmento compreendido entre os nucleotídeos 16024 e 576. Na região controle também está localizado o sítio de início da replicação do DNAm, o qual representa a origem da síntese da fita pesada (OH), além dos respectivos sítios de transcrição dos promotores (HSP1 e HSP2) (Chinnery e Hudson, 2013; Sun e John, 2016). Entretanto, apesar do genoma mitocondrial possuir uma maquinaria independente de replicação, a maioria das cerca de 1.500 proteínas mitocondriais são transcritas a partir de genes presentes no genoma nuclear, e antes de serem transportadas através da membrana mitocondrial, são traduzidas no citosol (Chinnery e Hudson, 2013; Stewart e Chinnery, 2015).

Com relação aos promotores, são três existentes no DNAm humano: os anteriormente citados HSP1 (*Heavy Strand Promoter 1*) e HSP2 (*Heavy Strand Promoter 2*), onde o primeiro é responsável pela transcrição dos dois RNAs ribossomais e o segundo pela transcrição do restante da cadeia pesada, constituindo um longo transcrito policistrônico que, posteriormente, é retirado via *splicing*, dando origem aos RNAs funcionais transportadores, ribossomais e ao mensageiro. Já o LSP (*Light Strand Promoter*) promove a transcrição da fita leve na forma também de um longo transcrito ou de vários transcritos iniciais pequenos (Figura 4) (Yusoff *et al.*, 2012; Stewart e Chinnery, 2015; Bailey e Doherty, 2017).

Figura 4 – Região controle do DNAm humano e os eventos de replicação e término da transcrição



Fonte: adaptada de FALKENBERG, 2018.

Durante o processo de replicação do DNAm uma terceira fita linear com cerca de 650 nucleotídeos é incorporada à região controle. Esta cadeia adicional, denominada 7S DNA, origina a estrutura estável do D-Loop (Figura 4) (Brown, Shine e Goodman, 1978; Nicholls e Minczuk, 2014; Falkenberg, 2018). A síntese de 7S DNA ocorre a partir de longas moléculas de RNA com aproximadamente 200 nucleotídeos (7S RNA), que por sua vez, é sintetizado entre o promotor da fita leve (LSP) e a região do bloco de sequências conservadas, CSB I. O término da replicação ocorre nas sequências associadas à terminação (TAS), entretanto, os mecanismos que regulam este processo ainda não são bem compreendidos (Jemt *et al.*, 2015; Falkenberg, 2018).

1.3 Fenômenos heteroplásmicos e sua aplicação na área forense

A presença de diferentes cópias do genoma mitocondrial em uma mesma célula de um indivíduo, ou em diferentes tecidos, denomina-se heteroplasmia. A condição para que uma célula ou tecido se tornem heteroplásmicos pode ser

determinada por um polimorfismo de sequência, ou seja, uma mutação de ponto (ou mutação pontual) de linhagem somática ou germinativa em um local específico – heteroplasmia de ponto (HP) – ou pela ocorrência de polimorfismo de tamanho, no caso, uma mutação do tipo inserção/deleção – heteroplasmia de comprimento (HC) (Andrew *et al.*, 2011).

Durante décadas, os laboratórios forenses realizaram análises de sequências mitocondriais provenientes das regiões hipervariáveis HVI e HVII, as quais, de fato, concentram a maioria do potencial de discriminação (Holland *et al.*, 2017). Contudo, a análise dos segmentos entre as regiões HVI e HVII juntamente com a região HVIII fornecem dados adicionais, aumentando seu poder de discriminação (Holland *et al.*, 2017).

Outro ponto que requer devida atenção, é a amplificação das regiões hipervariáveis em fragmentos separados, não incluindo os espaços entre elas. Tal fato, associado à manipulação de várias amostras ao mesmo tempo, aumenta a possibilidade de ocorrência de haplótipos quiméricos, ou recombinantes artificiais, resultantes da mistura inadvertida de segmentos mitocondriais de diferentes indivíduos (Parson *et al.*, 2014).

À medida que mais e mais populações vão sendo estudadas e, ainda, com o advento da análise completa do genoma mitocondrial humano por meio de técnicas de sequenciamento em larga escala, como o sequenciamento massivo paralelo (MPS – *Massive Parallel Sequencing*), por exemplo, aumenta também a necessidade de uma árvore filogenética robusta para um maior poder de resolução na distinção de haplogrupos e, conseqüentemente, maior precisão na sua classificação e na ancestralidade biogeográfica de um indivíduo.

1.3.1 Heteroplasmias de ponto

As variações heteroplásmicas normalmente não são utilizadas nas análises forenses para determinar a exclusão devido a alguns fatores como alta taxa de mutação do DNAm, gargalo genético, podendo resultar em mudanças completas de homoplasmia entre gerações, e o fato de haver variações heteroplásmicas entre os diferentes tipos de tecidos em um mesmo indivíduo. Contudo, a presença de

heteroplasmias de ponto (HP), ou heteroplasmias de sequência, em parentes maternos pode exercer um importante papel na determinação da não exclusão (Just *et al.*, 2015). O caso de identificação de membros da família Romanov, executada em julho de 1918, retrata a importância da correta identificação e análise das heteroplasmias. No referido caso, os restos mortais de cinco membros da família real russa (Tsar Nicholas II, Tsarina Alexandra, e três de suas filhas) encontrados no final da década de 70 por um geologista local, na Rússia, foram identificados com base na análise de marcadores STR autossômicos e na análise do DNAm. A linhagem materna da Tsarina Alexandra e das três filhas foi confirmada por meio da análise do DNAm entre os respectivos restos mortais e de parentes vivos da Tsarina. No caso da confirmação da relação de parentesco entre o imperador russo Nicholas II e seus parentes vivos, foi observada a presença de HP na posição 16169 (C/T = Y), mas não em seus parentes maternos analisados, cujas sequências apresentavam o nucleotídeo “T” na posição 16169. Os restos mortais de seu irmão Grand Duke Georgji Romanov, foram analisados posteriormente, e a mesma HP 16169Y foi encontrada, confirmando então, a autenticidade da heteroplasmia observada no Tsar Nicholas II (Coble *et al.*, 2009; Gill *et al.*, 1994; Ivanov *et al.*, 1996; Foster *et al.*, 2010).

1.3.2 Heteroplasmias de comprimento

A heteroplasmia de comprimento (HC) é um fenômeno muito comum e é definida como a ocorrência simultânea de duas ou mais sequências de policitosinas (poli-C) na região controle do mtDNA nas células de um mesmo indivíduo (Berger *et al.*, 2011). Os extratos poli-C são classificados de acordo com a interrupção ou não da sequência de citosinas por uma timina, havendo então, uma série de bases citosinas adjacentes. Quando uma sequência de citosinas não é interrompida por uma timina, como é o caso das mutações do tipo transição que ocorrem na posição 16189C (HVI) e 310C (HVII), há um padrão de mudança de fase logo após sequência de poli-C (Chun I-Lee *et al.*, 2016). Como há mais de um segmento de citosinas adjacentes numa mesma célula, e estas podem ocorrer em tamanhos diferentes, tais segmentos aparecem sobrepostos. Consequentemente, a

sobreposição dos nucleotídeos à jusante do homopolímero C, os quais aparecem misturados, impossibilita sua identificação, quando o método Sanger é utilizado (Berger *et al.*, 2011; Chun I-Lee *et al.*, 2016). A Comissão de DNA da Sociedade Internacional de Genética Forense (ISFG – *International Society for Forensic Genetics*) recomenda em seu guia para o sequenciamento do DNA mitocondrial, que haja redundância na análise de um mesmo segmento, afim de que erros (artefatos) não sejam reportados. Ou seja, a dificuldade na leitura e definição das sequências de nucleotídeos subsequentes aos segmentos homopoliméricos pode ser resolvida empregando-se oligonucleotídeos senso e anti-senso adicionais na amplificação destas regiões (Parson *et al.* 1998; Parson *et al.*, 2014).

Algumas teorias são discutidas sobre os mecanismos que levam a ocorrência de HC. Uma delas é que a quantidade absoluta de citosinas que desencadeia o deslizamento da DNA polimerase durante a síntese do DNAm, influenciando na fidelidade replicativa da enzima (Ellegren, 2004; Irwin *et al.*, 2009). A mistura de extratos de Poli-C de diferentes tamanhos também foi levantada como hipótese, porém estudos a partir da clonagem de segmentos de Poli-C de comprimentos variados, mostraram que a PCR não induz à amplificação de segmentos de tamanhos mistos a partir de um único segmento (Bendall e Sykes, 1995; Irwin *et al.*, 2009).

Do ponto de vista da interpretação dos dados, HC são em geral observadas quando a sequência ultrapassa oito bases idênticas. A dificuldade na interpretação dos nucleotídeos subsequentes ao poli-C se deve a uma limitação técnica, tendo em vista que o método de sequenciamento Sanger (por eletroforese capilar) não é eficiente neste caso, independente do equipamento utilizado (Parson *et al.*, 2014; Chung-I Lee *et al.*, 2015; Ballard, 2016; Holland *et al.*, 2017; Bhatti *et al.*, 2017). Desta forma, o método de Sanger não permite a resolução completa de variantes heteroplásmicas de comprimento. A correta interpretação e relato das HC têm grande importância, pois podem ser determinantes para a classificação de haplogrupos, como por exemplo o haplogrupo B característico do Oeste da Ásia, cuja transição 16189C está presente em cerca de 36% da população (Parson *et al.*, 2014). Por outro lado, Bhatti e colaboradores (2017) relataram a frequência de 6,9% e 5% da transição 16189C nos grupos étnicos *Sindhi* e *Baluchi* (Paquistão), respectivamente. Além disso, no campo das ciências forenses, o compartilhamento de heteroplasmias entre amostras de referência e amostras questionadas pode

aumentar significativamente o potencial de discriminação, fazendo com que, diante de uma coincidência de perfis, uma amostra não seja excluída de uma cena de crime, por exemplo (Just *et al.*, 2015; Holland *et al.*, 2017).

1.3.3 Nomenclatura das heteroplasmias

A adoção de padronização da nomenclatura ao relatar os polimorfismos das sequências geradas garante a consistência na representação dos haplótipos. Ausência de padronização ao relatar uma heteroplasmia de ponto, por exemplo, pode levar a uma falsa exclusão tanto para a comparação direta em casos forenses como na busca em bancos de dados populacionais, tendo em vista que, é sabido que pequenas variações nas sequências mitocondriais podem ser observadas em diferentes tecidos de um indivíduo ou ainda no mesmo tecido (Naue *et al.*, 2015; Huber, Parson e Dür, 2018). Para tal, os algoritmos usados nos programas de informática para comparação de sequências, podem solucionar essas diferenças incluindo análise baseada em cadeia de caracteres (Parson *et al.*, 2014; SWGDAM, 2013). O *Scientific Working Group on DNA Analysis Methods* – SWGDAM e a *DNA Commission of the International Society for Forensic Genetics* publicaram guias para análise e interpretação de dados de DNAm, com o intuito de padronizar metodologias e proporcionar alta qualidade das sequências para ambas as aplicações, buscas em bancos de dados e casos forenses (Parson *et al.*, 2014; SWGDAM, 2013).

O sistema de nomenclaturas adotado para nucleotídeos é determinado pelo *International Union of Pure and Applied Chemistry* – IUPAC (Irwin *et al.*, 2009; SWGDAM, 2013). A sobreposição de bases observada nas heteroplasmias de ponto segue a codificação a seguir (Tabela 1):

Tabela 1 – Convenção da IUPAC para nomenclatura de nucleotídeos

Mistura de bases	Código adotado	Mistura de bases	Código adotado
G/T	K	A/C	M
A/G	R	A/G/T	D
G/C	S	A/C/T	H
A/T	W	A/C/G	V
C/T	Y	C/T/G	B
A/C/G/T	N		

Fonte: adaptada de CORNISH-BOWDEN, 1985.

Os tipos mais relevantes de HC encontrados na RC do DNAm são:

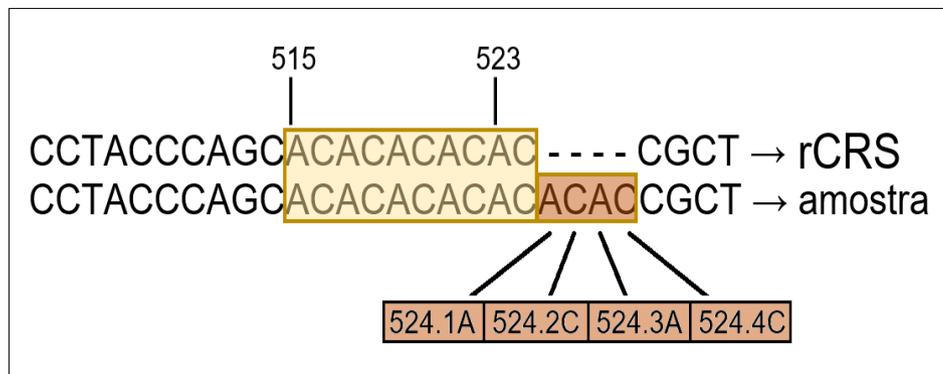
1) as posições 16183 a 16193 na região HVI:

A troca de um nucleotídeo na posição 16189 (T>C) gera um homopolímero C com 10 citosinas (também denominado de *C-strech*), podendo haver fragmentos de até 14 Cs de comprimento. A não interrupção desta longa extensão de nucleotídeos C pela ausência da timina (mutação do tipo transição) na posição 16189 causa grande dificuldade na interpretação dos resultados devido à incerteza no número de citosinas presentes de fato (Chun-I Lee *et al.*, 2016; Parson *et al.*, 1998; Parson *et al.*, 2014). De acordo com as recomendações da Comissão de DNA da ISFG (Parson *et al.*, 2014) deve-se identificar, sempre que possível a variante dominante, a molécula principal, presente em maior proporção, que no caso será representada pelo nucleotídeo de maior altura, não repetitivo, à jusante da sequência de policitosinas (G16196, por exemplo) (Figura 5). E, nos casos em que não for possível a identificação da variante dominante (casos raros onde há mais de uma variante dominante), tem-se admitido a busca pela menor variante dominante da HC (Parson *et al.*, 2014).

3) as posições 515 a 523 na região HVIII:

Tipicamente caracterizada por mais de cinco repetições do tipo dinucleotídeo AC a partir da posição 524, como mostrado na figura 8, ou ainda, deleção do dinucleotídeo AC nas posições 523 e 524.

Figura 8 – Representação esquemática da inserção de dinucleotídeos AC na posição 524 da região controle do DNAm

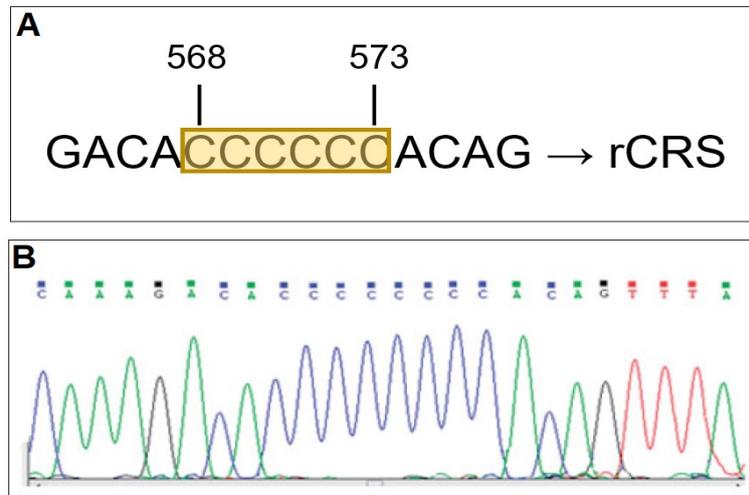


Fonte: A autora, 2019.

4) as posições 568 a 573 na região HVIII:

Ocorre como consequência da inserção de citosinas entre as posições 568 e 573 (Figura 9). Reportada em estudos anteriores como o de Brandstätter e colaboradores (2004), os quais observaram 5% da expansão poli-C em indivíduos da cidade de Nairobi, no Quênia (Irvin *et al.*, 2009). Contudo, HC nesta região não apresenta uma frequência alta, pelo contrário, esta HC tem sido reportada como assinatura filogenética de determinados haplogrupos, como por exemplo, o Haplogrupo I (Parson *et al.*, 2014).

Figura 9 – Homopolímero C entre as posições 568 e 573 na região HVIII do DNAm



Legenda: (A) representação esquemática do homopolímero C entre as posições 568 – 573, conforme rCRS (NC_012920). (B) Eletroferograma mostrando inserção de três citosinas em 573, formando um segmento poli-C com 12 resíduos no total.

Fonte: (A) A autora, 2019; (B) adaptada de BHATTI e colaboradores, 2017.

1.4 Haplogrupos mitocondriais e as migrações populacionais humanas

O consenso atual de que a origem do Homem Anatomicamente Moderno – HAM (AMH – *Anatomically Modern Human*) se deu há cerca de 200 mil anos na África, embora muito conflitante à época em que pesquisas apontavam para esta hipótese (Cann, Stoneking e Wilson, 1987; Vigilant *et al.*, 1991; Rosa e Brehm, 2011; Beltrame, Rubel e Prietokoff, 2016), teve a contribuição de diversas disciplinas, mas principalmente a partir de estudos nas áreas da paleoantropologia, paleoclimatologia, arqueologia e genética. Fósseis encontrados na Etiópia, Sudão, Tanzânia e Sul da África, assim como análise do DNAm reuniram fortes indícios da origem do HAM (Campbell *et al.*, 2014; Rito *et al.*, 2013; Gomez *et al.*, 2014; Campbell e Tishkoff, 2008). Todos estes dados apontam para o surgimento do *Homo sapiens* no período quaternário, ao final do Pleistoceno Médio. A origem do homem moderno no continente africano e sua dispersão pelo restante da África, pela Eurásia e, em seguida, para a Oceania e as Américas marcou o modelo *Out of Africa* (Saída da África, termo usado para caracterizar as migrações populacionais humanas a partir da sua origem no continente africano) (Campbell e Tishkoff, 2008;

Lockard, 2014). Tais evidências sustentam a teoria evolutiva de origem única, a qual postula que toda população humana existente atualmente descende de um único ancestral, tendo substituído as formas arcaicas de homínídeos sem que tenha havido cruzamento entre eles (Rosa e Brehm, 2011; Groucutt *et al.*, 2015; Green *et al.*, 2010).

Não obstante, outros modelos propõem diferentes teorias da evolução humana, como por exemplo, o modelo multirregionalista, cuja base teoriza que o homem moderno atual coexistiu com outras espécies homínídeas (Liang e Nielsen, 2011; Groucutt *et al.*, 2015; Green *et al.*, 2010; Simonti *et al.*, 2016; Veeramah e Hammer, 2014), onde o *Homo sapiens* evoluiu em diversas partes do mundo simultaneamente, mantendo a integridade das espécies pelo fluxo gênico recorrente, tendo inclusive havido hibridização entre *Homo sapiens* e *Homo neanderthalensis* e até entre espécies do período Denisovano (Green *et al.*, 2010; Liang e Nielsen, 2011; Veeramah e Hammer, 2014).

Com o intuito de organizar o conhecimento a respeito da diversidade biológica, estruturar as classificações das espécies e fornecer dados sobre os eventos que ocorrem durante a evolução, foram criadas as árvores filogenéticas, ou filogenias, como também são denominadas, as quais representam diagramas que delineiam as descendências de diferentes espécies, organismos ou genes partindo de um ancestral comum (Baum e Aye, 2008; Chinnery e Hudson, 2013).

Basicamente, uma árvore filogenética é constituída por raiz, que corresponde ao ancestral matrilinear recente mais comum (MRCA – *Most Recent Common Ancestor*) para a espécie humana (Reed e Tishkoff, 2006), por nós que constituem os pontos de ramificação (local onde ocorre a bifurcação) de uma população ancestral, os clados que são uma parte de uma filogenia compreendendo uma linhagem ancestral e seus respectivos descendentes e os ramos que são as linhas laterais a cada nó, as extremidades da árvore (Baum, 2008).

Em termos evolutivos, as informações provenientes do conhecimento acumulado até os dias atuais acerca da herança matrilinear, direciona a filogenia do genoma mitocondrial a uma linhagem ancestral comum mais recente, também conhecida como Eva mitocondrial (Reed e Tishkoff, 2006).

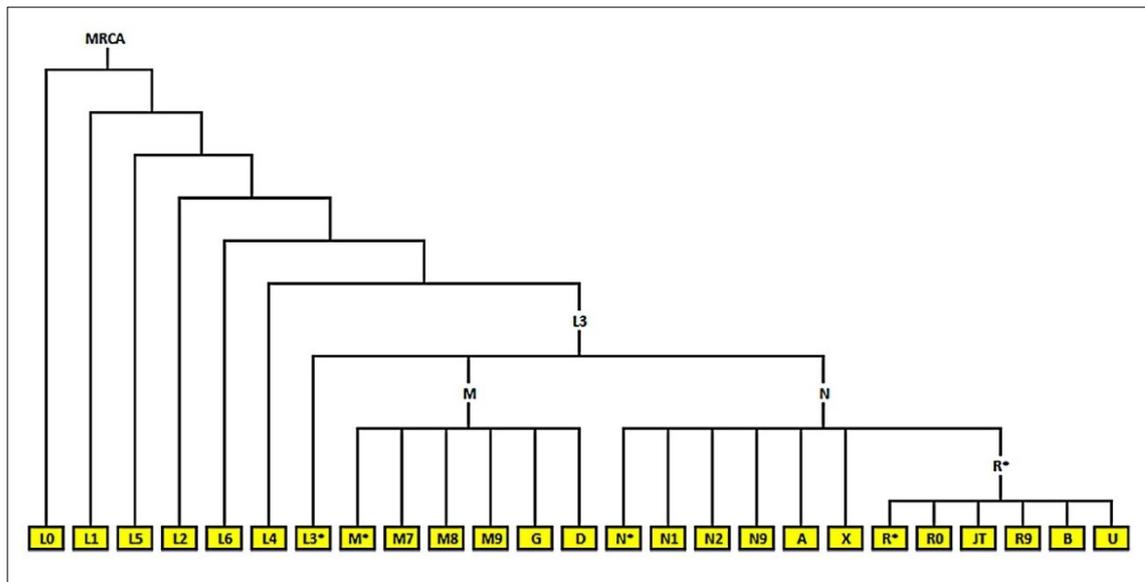
Além disso, ao se investigar com cuidado os polimorfismos de diferentes linhagens maternas, consegue-se identificar haplótipos que podem ser específicos de grupos étnicos e populacionais distintos em nível geográfico, configurando o

conjunto de informação molecular característico de determinadas zonas geográficas chamados de haplogrupos (Stewart e Chinnery, 2015).

Portanto, a filogenia do DNAm_t é organizada em vários haplogrupos principais caracterizados pelos polimorfismos de nucleotídeo único (SNP – *Single Nucleotide Polymorphism*) adquiridos durante a história humana (Stewart e Chinnery, 2015; Gomez *et al.*, 2014).

Assim, populações que são próximas e/ou têm uma origem comum, apresentam haplótipos que compartilham polimorfismos comuns, sendo esse conjunto de haplótipos referido a um haplogrupo (Torroni *et al.*, 1993). Em 2015, foi publicada a atualização mais recente da base de dados PhyloTree, Buil 17, com mais de 5.500 haplogrupos organizados de acordo com os nodos principais determinados na Figura 10 a seguir (Van Oven, 2015).

Figura 10 – Filogenia do DNAm_t com seus respectivos haplogrupos



Fonte: VAN OVEN, 2015.

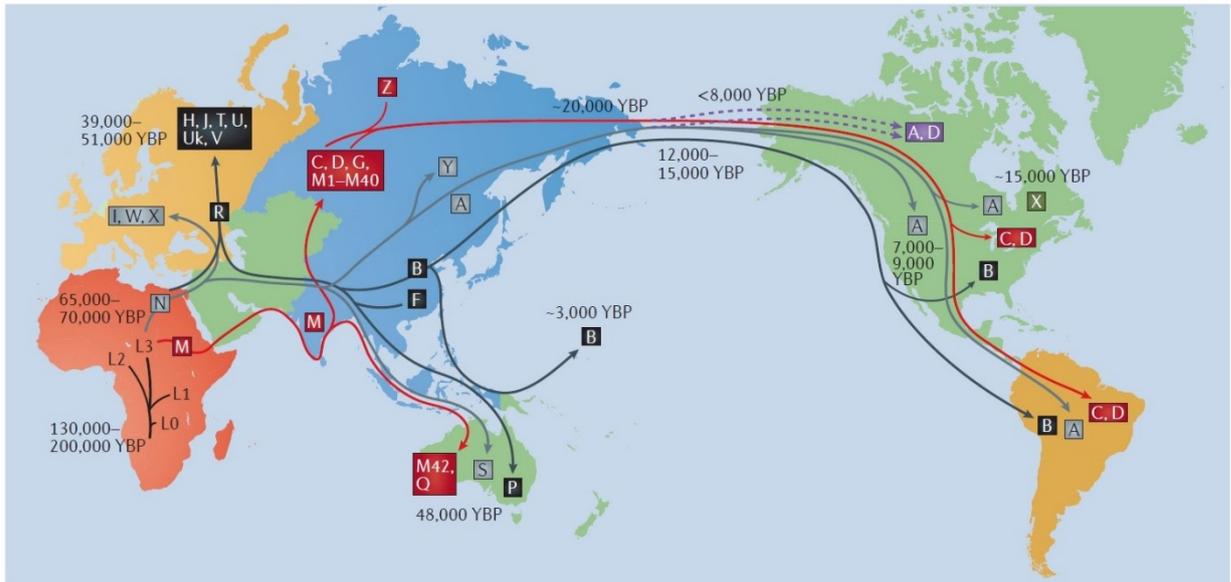
Os primeiros haplogrupos mitocondriais A, B, C e D foram assim nomeados por Torroni e colaboradores (1993) ao analisar amostras de 321 indivíduos de 17 populações nativo americanas. A partir de então, a nomenclatura dos haplogrupos passou a seguir o padrão de letras do alfabeto, (Torroni *et al.*, 2006; Van Oven e Kayser, 2008; Rosa e Brehm, 2011). No caso dos demais haplogrupos, estes foram

caracterizados posteriormente com definições de regras cladísticas que passaram a determinar a ordem hierárquica dos haplogrupos e sub-haplogrupos (Torroni *et al.*, 2006).

A origem do haplogrupo L, representa a linhagem mais antiga da filogenia mitocondrial, encontrada na África Subsaariana, há cerca de 200.000 anos (Salas *et al.*, 2007; Campbell e Tishkoff, 2008). O próximo nó da árvore filogenética, com múltiplas bifurcações, é o haplogrupo L3, surgido há aproximadamente 84.000 anos. De modo geral, está presente em populações africanas e não-africanas em todos os continentes e se subdivide em dois macro-haplogrupos oriundos da Eurásia, os haplogrupos M e N (entre 65.000 e 70.000 anos atrás). Seguindo a rota migratória, o haplogrupo M se deslocou em direção a Ásia, dando origem aos haplogrupos A, B, C, D, G e F. Com relação aos haplogrupos A, B, C e D, surgidos há menos de 20.000 anos, seus respectivos grupos populacionais ocuparam as regiões do Leste da Ásia e das Américas. Já o macro haplogrupo N deu origem ao haplogrupo R, há cerca de 60.000 anos (Macaulay *et al.* 2005; Salas *et al.*, 2007; Torroni *et al.*, 2006; Stewart e Chinery, 2015).

Por fim, as migrações populacionais do continente europeu encontram-se marcadas por um grande grupo de haplogrupos principais tais sejam, H, J, T, U, K (subgrupo de U), M, I, V, W e X (surgidos há cerca de 39.000 a 51.000 anos), tendo como raiz o macro haplogrupo R, com variantes de sequência específicas bem definidas para cada haplogrupo (Van Oven e Kayser, 2008; Chinnery e Hudson, 2013). A Figura 11 sumariza os caminhos percorridos pelos povos durante os períodos migratórios através dos continentes e os haplogrupos correspondentes.

Figura 11 – Mapa mundial representativo das migrações populacionais e distribuição geográfica dos respectivos haplogrupos principais do DNAmT



Fonte: STEWART E CHINNERY, 2015.

1.5 Contexto histórico da colonização do Brasil e sua influência na formação da população brasileira

A partir de meados do século XV a história das civilizações foi marcada por diversas ações desencadeadas pelos europeus na conquista dos continentes africano, americano e do Sul da Ásia. Tais ações contribuíram sobremaneira para o desenvolvimento territorial, econômico, social e cultural dos povos como um todo. Todavia, todas essas conquistas foram alcançadas às custas da exploração de pessoas por meio do trabalho escravo, inicialmente de índios nativos e africanos trazidos do Sudeste da África e, posteriormente, com o tráfico de escravos africanos somente (Boxer, 1969; Lockard, 2014). Mais especificamente em relação à América, a colonização europeia avançou logo após a descoberta da rota marítima para as Índias, campo onde, inegavelmente, Portugal ocupou posição de destaque com o detimento das tecnologias náuticas à época (Schwartz, 1988).

1.5.1 Os ameríndios

A forma como se deu a ocupação do duplo continente americano há cerca de 15 mil anos pelos ameríndios, embora ainda bastante discutida entre diferentes áreas do conhecimento, no que diz respeito, principalmente, ao número de ondas migratórias e a data mais provável do seu surgimento, é reconhecida através de evidências arqueológicas encontradas em vários locais da América do Sul, bem como através de dados genéticos e linguísticos (Perego *et al.*, 2010; Brandini *et al.*, 2018). A hipótese mais aceita para o povoamento das Américas pelo Homem Anatomicamente Moderno é a da migração pelo que hoje é conhecido como Estreito de Bering ou Beríngia, região localizada entre a Sibéria (Ásia) e o Alasca (América do Norte) (O'Rourke e Raff, 2010). A migração teria ocorrido através de uma faixa de terra que existiu durante o Último Máximo Glacial, período de maior extensão dos mantos de gelo do último período glacial, que marcou o final do Pleistoceno (Tamm *et al.*, 2007; Perego *et al.*, 2010; Veeramah e Hammer, 2014).

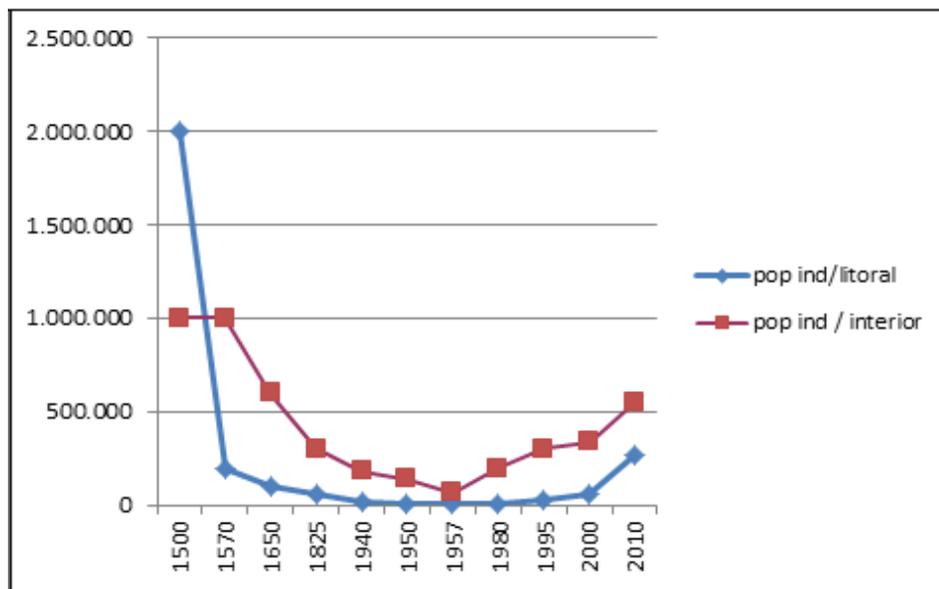
Após alcançarem a América do Norte via Beríngia, os ancestrais, se dispersaram para os demais territórios da América do Sul. Entretanto, há um consenso de que antes de migrarem pelo corredor do Estreito de Bering, ali permaneceram, provavelmente devido a uma barreira geológica, por tempo suficiente para proporcionar variações genéticas por deriva (Perego *et al.*, 2010; Bodner *et al.*, 2012; Brandini *et al.*, 2018).

Todos estes dados marcaram a presença dos nativos americanos como primeiros habitantes do continente Sul Americano, os quais foram os precursores de múltiplas civilizações, incluindo as dos Andes, da Amazônia e das costas dos oceanos Pacífico e Atlântico (Bodner *et al.*, 2012; Homburguer *et al.*, 2015). A conquista e, conseqüentemente, colonização do território pelos europeus a partir do século XVI, impulsionados também pela crescente migração europeia e pelo tráfico de escravos africanos resultaram na mistura interétnica de todos estes contingentes populacionais ao longo dos séculos subsequentes (Homburguer *et al.*, 2015).

No Brasil, a introdução de novos componentes étnicos na constituição da população se deu ainda no final século XV com a chegada dos europeus no continente Sul Americano. O contingente de nativos indígenas no Brasil, antes da chegada dos europeus, era de cerca de 2 milhões de indivíduos, conforme dados do

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. Este número foi drasticamente reduzido durante os quatro séculos do período colonial, mas, a partir da década de 80, vem sendo registrada uma constante ascendência da população indígena no país, com 896.217 pessoas (0,47% da população brasileira atual), de acordo com o último Censo em 2010 (Gráfico 1) (IBGE, 2007).

Gráfico 1 – Registro numérico das populações indígenas no Brasil de 1500 a 2010



Fonte: adaptado de AZEVEDO, M. M., 2013. Disponível em <http://www.funai.gov.br/index.php/indios-no-brasil/quem-sao>.

Logo após o descobrimento, entre os anos de 1500 e 1570, houve a tentativa de escravização dos índios, mas sem muito sucesso, haja visto que estes não eram suscetíveis a um sistema de trabalho forçado. Os motivos que levaram ao fracasso para a submissão dos índios ao trabalho foram, mais acentuadamente, em razão da dificuldade de integração sociocultural entre eles e os europeus e à suscetibilidade a doenças do Velho Mundo (Schwartz, 1988; Botelho, 2001). Esses fatores foram responsáveis pela diminuição drástica da população indígena no Brasil, inclusive com diversas etnias completamente dizimadas. Ainda assim, os resultados dessa curta interação entre nativos e colonizadores estão refletidos na herança genética da população brasileira atual (Boxer, 1969; Schwartz, 1988).

1.5.2 A presença africana

A partir da implantação das capitanias hereditárias em 1534, efetivamente, foi iniciado o processo de colonização do território pelos portugueses (Boxer, 1969; IBGE, 2007).

A dificuldade na escravização dos índios levou Portugal, na segunda metade do século XVI, a trazer escravos africanos para o Brasil, oriundos dos mercados escravistas da África Ocidental, dada a necessidade de suprir a alta demanda da produção do açúcar da cana (Schwartz, 1988). Posteriormente, porém, com o avanço da economia, a força de trabalho do negro escravizado acabou por ser empregada em diversas outras atividades, tais como: a produção de café, algodão, minérios e demais produtos de exportação, assim como, na agricultura de abastecimento interno, na pecuária e na produção de charque, nas pequenas manufaturas, no trabalho doméstico, entre outras (Schwartz, 1988; IBGE, 2007).

O reduzido número de portugueses, em termos populacionais, levou ao crescimento de uma categoria de “pessoas de cor” (mulatos), os quais já viviam em condições de liberdade. Com isso, os mestiços foram assumindo posições e cargos importantes nos municípios, com devida permissão da coroa portuguesa, a partir de 1539 (Schwartz, 1988). E assim, as interações étnicas foram se intensificando ao longo das gerações.

1.5.3. A migração europeia

A produção do açúcar impulsionou a expansão desta economia pelos territórios recém descobertos no Novo Mundo pelos portugueses e espanhóis a partir do século XVI (Schwartz, 1988). Assim, foi iniciado o processo de colonização do Brasil, com a abertura à exploração dos potenciais agrícolas da colônia. Entretanto, nos primeiros anos, entre 1500 e 1530, aproximadamente, período do estabelecimento das Capitanias Hereditárias, o interesse de Portugal era voltado

para a exportação do Pau Brasil. Após esse período, de fato, foram estabelecidas as tecnologias agrícolas da cana de açúcar (Botelho, 2001; Veríssimo, 1887). Toda esta produção necessitava da mão de obra escrava, conseguida através da escravização dos índios e da importação de escravos advindos, principalmente, da África Centro-Occidental. Quase que a totalidade do contingente de imigrantes portugueses que vieram para o Brasil a partir de 1500 era constituída por homens. Conseqüentemente, a união com as mulheres indígenas, legítima ou não, configurou-se como inevitável, uma vez que estas eram a única representação feminina na colônia, as quais serviam para as obrigações domésticas e como concubinas dos colonizadores (Salles, 1971; Botelho, 2001). Assim, foram denominadas categorias étnicas provenientes de tal miscigenação, sendo elas, o curiboca ou caboclo (cruzamento do branco europeu com a índia), o mameluco (cruzamento do curiboca com o branco), o cafuzo (cruzamento do negro com índio) e o mulato (mistura do negro com o branco), além dos inúmeros outros cruzamentos entre os mestiços originados dos primeiros (Veríssimo, 1887; Salles, 1971; Botelho, 2001).

Outras nações também compartilhavam do mesmo interesse de Portugal, como os franceses e os espanhóis, por exemplo (Schwartz, 1988; IBGE, 2007). A proximidade dos espanhóis dos territórios sob domínio português, devido à divisão estabelecida pelo Tratado de Tordesilhas, motivou diversas batalhas por conquista de regiões ainda não exploradas pelos lusitanos. Nesse contexto, a associação dos colonizadores de ambos os lados com os nativos indígenas constituiu estratégia contra os respectivos adversários na luta pelo território. Desta forma, foi cada vez mais intensa a mistura étnica com o passar dos anos, destes três componentes populacionais: o branco europeu, o escravo africano e o indígena (Veríssimo, 1887; Boxer, 1969; Botelho, 2001).

Após a independência em 1822 e mesmo com a abolição da escravatura em 1888, houve um crescente fluxo migratório de outros povos para o Brasil (italianos, alemães, judeus e árabes de diversos países da Europa e japoneses). Na realidade, a presença de diferentes nacionalidades europeias na América portuguesa é datada desde o final do século XV. A mudança nesse quadro ocorreu apenas a partir do final do século XIX para o século XX, quando então, foi observada uma drástica redução na vinda de imigrantes (Schwartz, 1988; Botelho, 2001; IBGE, 2007).

Em suma, os inúmeros cruzamentos populacionais ocorridos desde 1500 representados, principalmente, pela entrada dos colonizadores europeus, mais intensamente por espanhóis e portugueses, e pela implantação do sistema escravista por meio do comércio de africanos, tendo também a inserção de outros grupos de imigrantes de procedência variada formaram o miscigenado patrimônio étnico brasileiro, com uma identidade cultural múltipla, híbrida e original (IBGE, 2007).

1.6 Importância da construção de banco de dados para fins de identificação humana

1.6.1 No âmbito civil

O genoma mitocondrial humano constitui foco de estudos em três áreas principalmente: na genética médica, onde a busca por mutações deletérias tem utilidade no diagnóstico e no tratamento de patologias associadas; na genética populacional (ou antropologia molecular) que estuda as variações genéticas dentro das populações, relacionando mudanças nas frequências dos genes e alelos no tempo e no espaço; e na genética forense, cuja utilização tem demonstrado ser eficaz na tentativa de relacionar indivíduos pertencentes a uma mesma linhagem em determinados casos (Salas *et al.*, 2007; Parson e Dür, 2007; Van Oven e Kayser, 2008). De modo geral, a análise do DNAMt tem sido útil no campo da genética forense quando altos níveis de degradação do DNA nuclear não permitem sua análise pelos marcadores autossômicos, ou quando há quantidades mínimas disponíveis de material genético para análise.

Com o crescimento das pesquisas com DNAMt, independentemente da sua aplicação, surgiu também a necessidade da criação de bancos de dados de DNAMt que têm como finalidade estimar as frequências de sequências nas diversas populações, além de padronizar os procedimentos para a correta determinação dos haplogrupos, estabelecer normas para o controle de qualidade das análises e, assim, minimizar os erros e servir como uma fonte de referência confiável (Salas *et*

al., 2007; Parson e Dür, 2007; Bandelt, Van Oven e Salas, 2012; Parson *et al.*, 2014). Existem várias bases de dados de DNAm humano disponíveis para acesso como o MITOMAP (Kogelnik *et al.*, 1996), EMPOP (Parson e Dür, 2007), HaploGrep (Kloss-Brandstätter *et al.*, 2011), MtDB (Ingman e Gyllensten, 2006), MitoTool (Fan e Yao, 2011), PhyloTree Build 17 (Van Oven e Kayser, 2008; Van Oven, 2015).

A base de dados EMPOP tem sido a principal referência em plataformas para esse fim, onde juntamente com ISFG e o SWGDAM, formularam regras para garantir a qualidade das sequências depositadas na base de dados e enviadas para publicação (Parson e Dür, 2007; Huber, Parson e Dür, 2018).

1.6.2 No âmbito militar

O armazenamento de material genético de militares vem sendo empregado pelas Forças Armadas de vários países, com o intuito de servir como amostra de referência para a identificação de militares, em tempo de paz ou de guerra, em caso de morte em serviço, quando não for possível utilizar os métodos convencionais de identificação da pessoa. Em muitos casos, a análise do DNA constitui a única ferramenta disponível a ser utilizada para identificação humana, como por exemplo, em acidentes aéreos, cada vez mais frequentes na atualidade, e acidentes com explosivos. Partindo de tal premissa, torna-se necessário ressaltar que a população militar de qualquer país, devido à natureza da sua atividade fim, constitui grupo de risco para mortes violentas, por estar mais exposta a trabalhos operacionais e em contato com materiais bélicos do que a população civil em geral. A ocorrência de carbonização do corpo (total ou parcial) é um exemplo de situação que pode demandar a necessidade de análise do DNA mitocondrial, devido à presença de degradação do DNA, como já comentado na parte introdutória do presente estudo.

A criação e a manutenção de um banco de dados de perfis genéticos sob o suporte de um repositório de amostras biológicas são de suma importância face ao fato de o Exército Brasileiro e demais Forças Armadas estarem, efetivamente, nos últimos anos, participando de missões no exterior e de operações de Garantia da Lei e da Ordem. Tal contexto tem demonstrado um consequente aumento do emprego dos contingentes militares brasileiros em missões que, objetivamente, configuram

elevado risco. Ainda, esta atividade se destaca devido à necessidade de um controle administrativo da Força de maneira mais efetiva, impondo deslocamentos constantes, tanto terrestres quanto aéreos, e da crescente concentração de organizações militares nas regiões fronteiriças, resguardando uma preocupação estratégica com relação ao tráfico de armas e drogas, bem como, a instabilidade política de alguns vizinhos (Nogueira, 2009).

Como exemplo da estratégia de armazenamento de material genético de militares com fins de identificação em outros países é possível ressaltar o Repositório de DNA das Forças Armadas Norte Americanas – AFRSSIR – (*Armed Forces Repository of Specimen Samples for the Identification of Remains, Dover, Delaware*). Desde 1990, têm sido coletadas amostras de militares, servidores civis do Departamento de Defesa e funcionários de outros órgãos do governo que prestam apoio às Forças Armadas em territórios estrangeiros hostis.

Outra aplicação de elevada importância dos bancos de dados de DNA é a identificação de desaparecidos, a partir de seus restos mortais antigos, possibilitando o resgate de acontecimentos históricos, onde dados de linhagens mitocondriais são extremamente úteis. No âmbito militar, a identificação de desaparecidos em conflitos bélicos passados se transformou, nos últimos anos, em um esforço mundial, onde toda nação deve ser capaz de identificar os seus mortos de guerra, sendo este, portanto, o motivo principal para a existência de bancos de DNA militares pelo mundo. Em junho de 1998, o laboratório de DNA das Forças Armadas dos EUA (*Armed Forces DNA Identification Laboratory – AFDIL, Dover, Delaware*) identificou o americano Michael Joseph Blassie, veterano da Guerra do Vietnã, que foi enterrado como soldado desconhecido no Cemitério Nacional de Arlington (Butler, 2005). Nesta mesma linha de ação, Portugal tenta identificar seus soldados mortos por intermédio da análise de DNA de cadáveres exumados do Cemitério de Farim, na Guiné-Bissau, próximo à fronteira com o Senegal (Nogueira, 2009).

No Brasil, tal atividade teve início no ano de 2005 devido ao envio de tropas brasileiras para as missões de paz no Haiti. Desde então, os integrantes dos contingentes brasileiros empregados na MINUSTAH (Missão das Nações Unidas para a Estabilização do Haiti), constituídos por militares do Exército Brasileiro, da Marinha do Brasil e da Força Aérea Brasileira, tem tido suas amostras de sangue coletadas e armazenadas no Repositório de Amostras do Exército (RAEx), no

Instituto de Biologia do Exército, no Rio de Janeiro, o qual possui, no momento, aproximadamente 30 mil amostras armazenadas.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Estudar a ancestralidade da população brasileira por meio da análise completa da região controle do DNA mitocondrial em indivíduos provenientes das regiões Centro-Oeste, Norte e Nordeste do país.

2.2 Específicos

- Determinar os haplótipos da região controle do DNA mitocondrial de amostras populacionais humanas representativas das regiões Centro-Oeste, Norte e Nordeste do Brasil e avaliar seu padrão de diversidade.
- Classificar os distintos haplogrupos do DNAm_t encontrados nas três regiões, de acordo com a sua origem ancestral africana, nativo americana e europeia;
- Comparar os dados de sequenciamento do DNAm_t das populações estudadas entre si, bem como com dados de sequências de outras populações brasileiras e avaliar o padrão de distância genética;
- Contribuir para a construção de banco de dados de perfis genéticos representativo das linhagens maternas brasileiras, com base no DNA mitocondrial.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 População, Seleção das Amostras para o estudo e Aspectos éticos

O presente estudo obteve aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto – CEP HUPE/UERJ – (Anexo D) sob o número de parecer 1.542.187 (CAAE 55747516.0.0000.525), tendo sido desenvolvido no Laboratório de Diagnósticos por DNA (IBRAG, UERJ) e na Seção de Genética do Instituto de Biologia do Exército, fruto da parceria firmada entre as citadas instituições por meio do Programa Pró-Defesa 3 (CAPES/Ministério da Defesa).

As amostras selecionadas são pertencentes a militares das Forças Armadas, não relacionados geneticamente, majoritariamente do sexo masculino (97,8% homens, 2,2% mulheres), com idades entre 18 e 54 anos. Os mesmos participaram de missões oficiais no exterior e, por este motivo, possuem seus materiais biológicos armazenados no Repositório de Amostras do Exército Brasileiro (RAEx), no Instituto de Biologia do Exército, localizado no Rio de Janeiro. Foram incluídas no estudo 413 amostras de sangue sem anticoagulante depositadas em papel de filtro tratado FTA *Classic Card* (Whatman/GE) de militares nascidos em 17 Estados, compreendendo as regiões geográficas Centro-Oeste, Norte e Nordeste (Quadro 1). A distribuição das amostras estudadas, de acordo com a região de origem, pode ser observada no mapa constante da Figura 12.

Quadro 1 – Distribuição das amostras biológicas de militares provenientes das regiões Centro Oeste, Norte e Nordeste por Estado

Regiões Geográficas do Brasil	Estados	Quantidade	Total por Região
Centro-Oeste	Distrito Federal	41	159
	Goiás	42	
	Mato Grosso do Sul	41	
	Mato Grosso	35	
Norte	Acre	36	154
	Amazonas	31	
	Amapá	21	
	Pará	31	
	Roraima	11	
	Tocantins	24	
Nordeste	Alagoas	18	100
	Bahia	16	
	Ceará	11	
	Maranhão	13	
	Pernambuco	16	
	Piauí	15	
	Rio Grande do Norte	11	

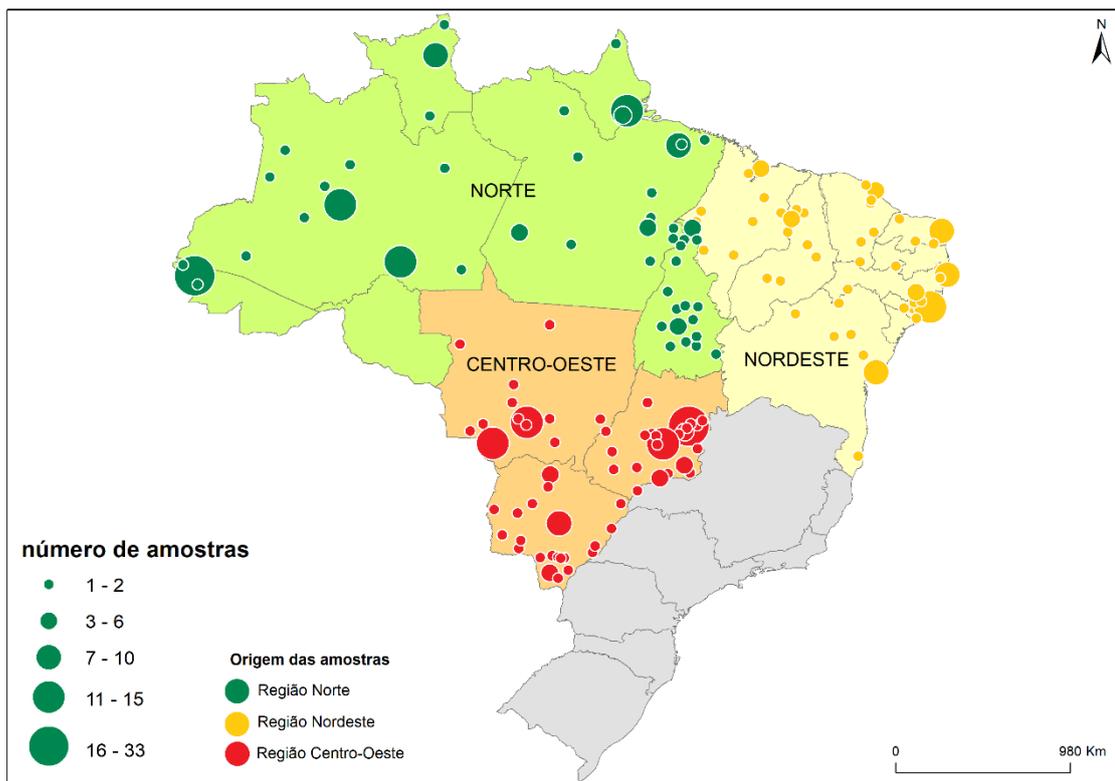
Fonte: A autora, 2019.

As amostras selecionadas para este estudo foram somente as dos militares que autorizaram a sua utilização mediante Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Com relação às informações dos sujeitos da pesquisa, foram utilizados os seguintes dados demográficos: naturalidade, etnia (autodeclarada) e idade.

Embora as amostras selecionadas tivessem autorização para utilização em estudos científicos, optou-se por anonimizar as mesmas logo após a coleta dos dados demográficos necessários.

O presente estudo foi desenvolvido por meio de pesquisa experimental, tendo como base as seguintes etapas: seleção das amostras do Repositório do Exército de acordo com o Estados de nascimento, picotagem e lavagem dos papéis de filtro contendo as amostras, reação de amplificação, purificação dos produtos de amplificação, eletroforese em gel de agarose, reação de sequenciamento, purificação dos produtos de extensão, análise das sequências com o uso de ferramentas computacionais de acordo com os grupos estudados, análise estatística e construção de banco de dados.

Figura 12 – Mapa da distribuição geográfica das amostras analisadas

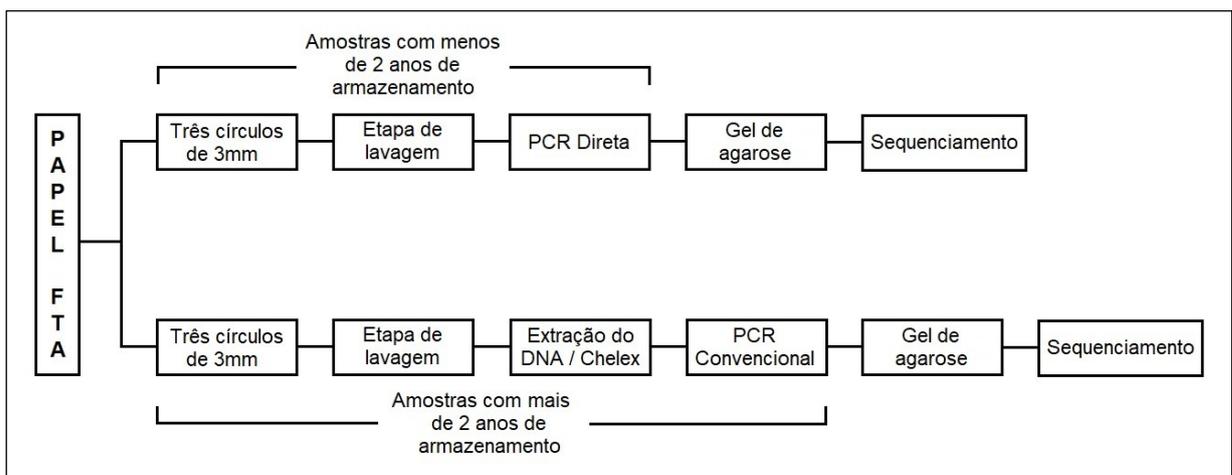


Fonte: A autora, 2019.

3.2 Descrição do Método

Diante da percepção de diferenças no padrão de amplificação das amostras no início do estudo, foi necessário desenvolver metodologias distintas de acordo com o tempo de armazenamento das amostras, nas etapas de pré-amplificação e de amplificação propriamente dita (Figura 13). O protocolo desenvolvido no presente trabalho foi apresentado em reunião científica e publicado na revista *Forensic Science International: Genetics Supplement Series* (Apêndice B). As amostras com menos de dois anos de armazenamento foram processadas por PCR direta, eliminando-se a etapa de extração de DNA. Já para as amostras com mais de dois anos de armazenamento foi realizada extração do DNA com o emprego da resina Chelex 100 *molecular biology grade resin 200-400 mesh sodium form* (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA) (Walsh, Metzger e Higuchi, 1991), seguida de reação de amplificação do DNA convencional. Tal adaptação foi necessária pois o tempo de armazenamento prolongado pode promover maior adesão da molécula do DNA à matriz do papel de filtro (Stangegaard *et al.*, 2011; Kornienko *et al.*, 2014), o que demandou protocolo específico para tais amostras, conforme se segue:

Figura 13. Desenho experimental



Fonte: A autora, 2019.

3.2.1 Amostras com menos de dois anos de armazenamento

As amostras com tempo inferior a dois anos necessitaram de cerca de duas horas apenas para que o papel estivesse totalmente claro, livre da presença de hemácias, conforme o protocolo descrito a seguir:

1) Picotagem e lavagem dos papéis de filtro

Foram picotados três círculos de 3.0 mm de diâmetro com o uso do picotador Harris Uni-Core Punch (GE/Whatman). Estes foram submetidos a uma etapa de lavagem para remoção das hemácias com 280 µL de solução de purificação (1M Tris-HCl pH 8,0, 0,5M EDTA pH 8,5, Triton-X 100 e ddH₂O) e 20 µL de proteinase K fungal (<20U/mg), seguidos por incubação em termoagitador (Thermomixer AG Eppendorf) a 56°C com agitação de 900 RPM, por duas horas. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e as amostras foram lavadas com 300 µL de água destilada, por cinco vezes e, por fim, foram secas à temperatura ambiente.

2) Reação de amplificação direta

A amplificação pela PCR foi realizada com o kit GoTaq® DNA Polimerase (*Promega Corporation*), conforme protocolo detalhado na Tabela 2. Foi utilizado o par de oligonucleotídeos L15879 (senso, 5'-AATGGGCCTGTCCTTGTAGT-3') e H727 (anti-senso, 5'-AGGGTGAACCTCACTGGAACG-3'), de Cardena e colaboradores (2013), para amplificar toda a região controle do DNA mitocondrial, gerando um fragmento amplificado de 1.417 pares de bases, no termociclador Veriti® 96 Well Thermal Cycler (*Applied Biosystems, Foster City, CA*), sob as seguintes condições termocíclicas: desnaturação inicial a 95°C por 15 minutos, seguida por 35 ciclos a 94°C por 30 segundos, 60°C por 90 segundos, 72°C por 60 segundos, e extensão final a 72°C por 10 minutos. Posteriormente, na reação de sequenciamento, serão

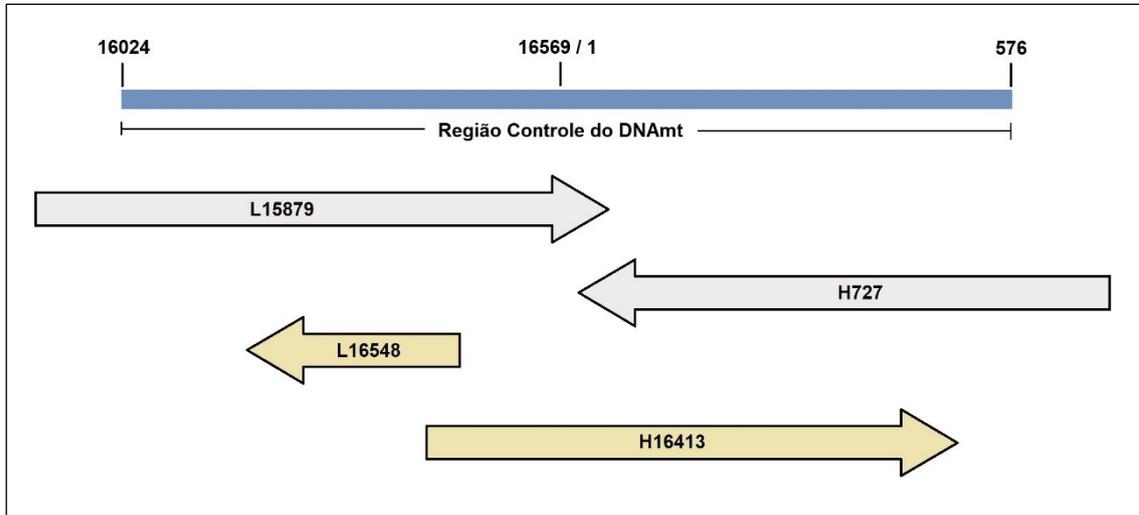
utilizados os mesmos oligonucleotídeos da etapa de amplificação, em reações separadas, com a inclusão de oligonucleotídeos internos adicionais, para algumas amostras, quando necessário. O esquema de amplificação e sequenciamento é mostrada na Figura 14 e o detalhamento das reações de extensão serão abordadas no subitem 3.2.4.

Tabela 2 – Protocolo de amplificação direta

Reagentes	Concentração inicial	Quantidade (µL)	Concentração final
GoTaq® Flexi Buffer (c/ 1,5 mM de MgCl₂)	5X	5,0	1X
Primer L15879 (senso)	2,5 µM	2,0	0,2 µM
Primer H727 (anti-senso)	2,5 µM	2,0	0,2 µM
MgCl₂	25 mM	3,0	3,0 mM
Mistura de dNTPs (Qiagen)	10 mM cada	0,5	200 µM cada
Taq DNA polimerase (GoTaq® Hot Star, Promega Corporation)	5 U/µL	0,125	1,5 U/reação
Amostra	-	3 círculos de 3.0 mm lavados	-
H₂O purificada	-	12,375	-
Total	-	25,0	-

Fonte: A autora, 2019.

Figura 14 – Estratégia de amplificação e sequenciamento da região controle de DNAm



Legenda: O par de oligonucleotídeos L15879 (senso) e H727 (anti-senso), destacados pelas setas de cor cinza, foi usado para a reação de amplificação. Já para as reações de sequenciamento, tanto os primers internos, H16413 (senso) e L16548 (anti-senso), indicados nas setas de cor amarela, como os oligonucleotídeos externos usados na amplificação.

Fonte: A autora, 2019.

3.2.2 Amostras com mais de dois anos de armazenamento

1) Picotagem e lavagem dos papéis de filtro

Para estas amostras foi seguido o mesmo protocolo realizado no item 1, da subseção 2.2.1, para amostras recentes, com diferença apenas no tempo de incubação. Neste caso, as amostras permaneceram no banho a 56°C com agitação até o dia seguinte, perfazendo uma média de 10 a 14 horas de incubação. Contudo, foi necessário trocar a solução de lavagem nas primeiras duas horas de incubação, devido à saturação da mesma.

2) Extração do DNA

Os círculos lavados e secos foram submetidos à extração do DNA pelo método Chelex, onde foram adicionados 200 µL da resina Chelex em solução a 5% aos três círculos de papel. Estes foram incubados a 56°C durante 20 minutos, em seguida foram submetidos a agitação em *vortex* por aproximadamente 15 segundos. Posteriormente, foi realizada nova incubação a 100°C por 8 minutos, seguida de agitação por 15 segundos. Por fim, as amostras foram centrifugadas durante três minutos a 20.000 x g. O sobrenadante foi transferido para outro tubo para posterior utilização na reação de amplificação.

3) Reação de amplificação convencional

Esta etapa de amplificação se diferenciou da reação de amplificação direta apenas pela adição de DNA extraído, seguindo o protocolo abaixo (Tabela 3):

Tabela 3 – Protocolo de amplificação convencional

Reagentes	Concentração inicial	Quantidade (µL)	Concentração final
GoTaq® Flexi Buffer (c/ 1,5 mM de MgCl₂)	5X	5,0	1X
Primer L15879 (senso)	2,5 µM	2,0	0,2 µM
Primer H727 (anti-senso)	2,5 µM	2,0	0,2 µM
MgCl₂	25 mM	3,0	3,0 mM
Mistura de dNTPs (Qiagen)	10 mM cada	0,5	200 µM cada
Taq DNA polimerase (GoTaq® Hot Star, Promega Corporation)	5 U/µL	0,125	1,5 U/reação
Amostra (DNA extraído)	-	12,375	-
Total	-	25,0	-

3.2.3 Purificação dos produtos amplificados

Após as etapas de pré amplificação e de amplificação, todas as amostras, independente do tempo de armazenamento, seguiram os mesmos protocolos nas etapas subsequentes à amplificação. Assim, os produtos de amplificação gerados foram avaliados quanto à qualidade e à quantidade em gel de agarose a 1%. A avaliação da quantidade relativa de produto amplificado foi realizada empiricamente por meio da comparação das bandas das amostras no gel com marcador de massa molecular *Low mass DNA ladder* (Invitrogen). Em seguida, foi realizada a purificação dos produtos de amplificação, com o reagente ExoSAP 2IT® (USB Corporation), que consiste na mistura das enzimas exonuclease I e fosfatase alcalina de camarão, na proporção de 2 µL do reagente para cada 5 µL de produto de PCR.

3.2.4 Reação de sequenciamento e purificação dos produtos de extensão

A reação de sequenciamento foi realizada com o conjunto de reagentes *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing* (Applied Biosystems), com os oligonucleotídeos descritos na Tabela 4 e seguindo o protocolo discriminado na Tabela 5. Amostras que apresentaram heteroplasmia de comprimento nas posições 16189 (T<C), 309 (inserção de duas citosinas) e 573 (inserção a partir de duas citosinas) necessitaram de reações de extensão adicionais com os oligonucleotídeos internos L16548 (anti-senso) e H727 (senso), cujas sequências também constam da Tabela 4, a seguir:

Tabela 4 – Oligonucleotídeos utilizados na reação de sequenciamento

Oligonucleotídeos	Sequência	Referência
L15879 (Senso)	5'-AATGGGCCTGTCCTTG TAGT-3'	Cardena <i>et al.</i> , 2013
H727 (Anti-senso)	5'-AGGGTGA ACTCACTGGAACG-3'	
L16548 (Anti-senso)*	5'-GGGAACGTGTGGGCTATTTA-3'	
H16413 (Senso)*	5'-TGAAATCAATATCCCGCACA-3'	

Legenda: *oligonucleotídeos adicionais utilizados na reação de sequenciamento em amostras com heteroplasmia de comprimento.

Fonte: A autora, 2019.

Tabela 5 – Protocolo da reação de sequenciamento

Reagentes	Concentração inicial	Quantidade (µL)	Concentração final
BDT RR 100		1,0	
Buffer 5X	5X	1,5	0,5X
Oligonucleotídeo (senso ou anti-senso)	2,5 µM	1,3	0,25 µM
Produto de PCR		2,0	
H₂O purificada	-	4,2	-
Total	-	10,0	-

Legenda: BDT RR 100 (*Big Dye Terminator Ready Reaction 100*).

Fonte: A autora, 2019.

Em seguida, a purificação dos produtos de extensão foi realizada com o uso da resina *Sephadex™ G-50 Medium* (*GE Healthcare Bio-Sciences AB*, Upsala, Suécia) em solução (3,3 g de resina em 50 mL de água ultrapura), onde foram adicionados 700 µL da referida solução a um tubo contendo uma coluna com filtro de celulose regenerada (*QIAGEN*), seguida de centrifugação durante 3 minutos a 2.000 x g. O filtrado foi descartado e todo o volume do produto de extensão purificado foi adicionado sobre a resina seca no interior da coluna. Por último, o tubo foi centrifugado durante 1 minuto a 1.000 x g.

3.2.5 Eletroforese capilar

Os produtos purificados da reação de sequenciamento foram submetidos à eletroforese capilar na plataforma *ABI Prism® 3500 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems, Foster City, CA), utilizando-se 1 µL do produto de extensão purificado na etapa anterior com 10 µL de Formamida (Applied Biosystems, Foster City, CA), para injeção da amostra no equipamento.

3.2.6 Análise das sequências com base nas ferramentas computacionais

Inicialmente, as sequências obtidas na eletroforese capilar foram avaliadas quanto à qualidade do sequenciamento com o uso do programa *DNA Sequencing Analysis software v5.2* (Applied Biosystems, Foster City, CA). Em seguida, foi utilizado o programa *SeqScape v5.2* (Applied Biosystems, Foster City, CA), para a anotação dos polimorfismos encontrados em divergência com a sequência referência de Cambridge revisada (rCRS) (Anderson *et al.*, 1981), número de acesso no GenBank NC_012920, bem como para as devidas correções dos polimorfismos automaticamente anotados pelo próprio programa. Uma vez feitas as anotações de todos os polimorfismos das amostras sequenciadas, os haplótipos foram analisados na plataforma online *EMPOP mtDNA Database, v4/R11* (Parson e Dür, 2007; Huber, Parson e Dür, 2018), a fim de se obter a classificação dos respectivos haplogrupos mitocondriais.

Os critérios seguidos para o controle de qualidade na anotação dos polimorfismos e consequente determinação dos haplogrupos foram baseados na utilização da ferramenta “*Phylogenetic Alignment*”, integrante da base de dados EMPOP, que foi incluída na última atualização em 10 de setembro de 2018, com a publicação da versão 4 e a ferramenta “*EMPcheck*”, também da base de dados EMPOP. Além de observadas as recomendações da ISFG e do SWGDAM (Parson *et al.*, 2014; SWGDAM, 2013).

O alinhamento das sequências do presente estudo, juntamente com as sequências das populações utilizadas para as análises de comparação inter e

intrapopulacionais foi realizado com o auxílio da ferramenta computacional online HaploSearch (Fregel e Delgado, 2011).

3.2.7 Cálculo dos índices de diversidade genética

Foram utilizados os dados amostrais dos seguintes estudos: 142 sequências do Estado de São Paulo (Prieto *et al.*, 2011), 95 sequências do Estado do Espírito Santo (Sanches *et al.*, 2014), 205 sequências do Estado do Rio de Janeiro (Simão *et al.*, 2018) e 80 sequências do Estado de Santa Catarina (Palencia *et al.*, 2010). As comparações, tanto entre as populações do presente estudo, como com populações brasileiras de outros estudos, foram realizadas com o uso do pacote de *softwares* Arlequin versão 3.5.2.2 (Excoffier, Laval e Schneider, 2005; Excoffier e Licher, 2010) para os cálculos de distância genética e índices de diversidade genética.

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização das sequências mitocondriais

A análise completa da região controle do DNA mitocondrial dos 413 indivíduos estudados forneceu dados importantes acerca das três regiões geográficas selecionadas, tendo em vista a inexistência de trabalhos, especialmente das regiões Centro Oeste e Norte.

As amostras foram amplificadas com os primers L15879 (senso) e H727 (anti-senso), que produziram fragmentos com 1.136 pares de bases na região Centro Oeste, 1.143 na região Norte e 1.135 na região Nordeste. O limite utilizado para a classificação dos haplogrupos foi das posições 16024 a 576, compreendendo toda a região controle, inclusive os espaços entre as três regiões hipervariáveis.

Com relação aos polimorfismos de comprimento (Tabela 6), 30,89% das amostras da região Centro Oeste e 27,92% da região Norte apresentaram a mutação do tipo transversão na posição T16189C na região HVI, enquanto que na região Nordeste, 10% dos indivíduos apresentaram a referida mutação. Entre as posições 303 e 315 em HVII foi observada a presença da mutação T310C em apenas um indivíduo da região Centro-Oeste. Na região HVIII os polimorfismos encontrados foram do tipo inserção ou deleção de dinucleotídeos AC entre as posições 513 e 524, cujas proporções de inserção nas três regiões geográficas do país analisadas foram de 3,77% no Centro-Oeste, 3,00% no Nordeste e 6,49% no Norte e as proporções de deleção foram de 35,85% na região Centro-Oeste, 55,00% na região Nordeste e 48,05% na região Norte. Já as inserções no trecho 562-573 foram também observadas nas três regiões estudadas, sendo 2,52% no Centro-Oeste, 3,00% no Nordeste e 5,84% na região Norte. Para os polimorfismos que têm como consequência a formação de longo fragmento homopolimérico de citosinas, houve a necessidade de reação de amplificação adicional com os oligonucleotídeos internos L16548 (anti-senso) e H16413 (senso), conforme ilustrado na Figura 14.

Tabela 6 – Frequência de heteroplasmia de comprimento por região geográfica

Região	Polimorfismo	Centro-Oeste		Nordeste		Norte		Total	
		n = 159	%	n = 100	%	n = 154	%	n = 413	%
HVI	16184-16193 (poli C)*	48	30,89	10	10,00	43	27,92	101	24,46
HVII	303-315 (poli C)*	1	0,63	-	-	-	-	1	0,24
HVIII	513-524 (poli AC)	6	3,77	3	3,00	10	6,49	19	4,60
	513-524 (deleção AC)	57	35,85	55	55,00	74	48,05	186	45,04
	568-573 (poli C)*	4	2,52	4	3,00	9	5,84	17	4,12

Legenda: * Sequências a partir de oito citosinas subsequentes. A inserção 315.1C é uma condição estável, presente na maioria dos indivíduos. A heteroplasmia de comprimento localizada entre o trecho 302-316 não representa, portanto, um *hotspot*. Na tabela foi reportada apenas uma amostra da região Centro-Oeste que apresentou a mutação T310C, caracterizando, assim, um longo homopolímero de citosinas.

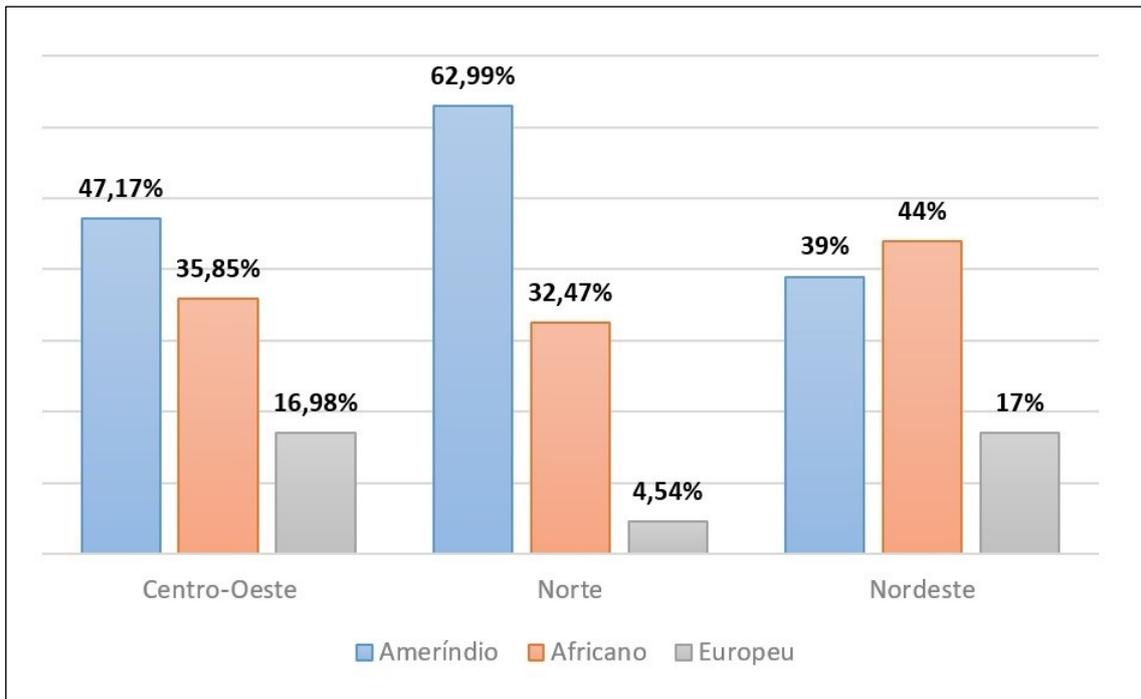
Fonte: A autora, 2019.

4.2 Classificação e frequência dos haplogrupos

Conforme os dados constantes do Gráfico 2, quanto à frequência dos haplogrupos por região, das 413 amostras analisadas, a região Norte foi a que evidenciou maior número de ancestralidade ameríndia (62,99%), seguida da região Centro-Oeste, com 47,17% e por último, a região Nordeste, com 39%. Já a presença de haplogrupos que marcam a ascendência africana foi maior nos indivíduos oriundos da região Nordeste (44%), seguida pelas regiões Centro-Oeste e Norte, que apresentaram percentuais aproximados, sendo 35,85% e 32,47%, respectivamente. Por fim, a origem europeia foi proporcionalmente semelhante nas regiões Nordeste (17%) e Centro-Oeste (16,98%), enquanto que na região Norte do

país a linhagem materna de origem europeia foi expressa em números bem reduzidos (4,54%).

Gráfico 2 – Distribuição das linhagens ameríndia, africana e europeia de três regiões do Brasil (Centro-Oeste, Norte e Nordeste)



Fonte: A autora, 2019.

4.2.1 Região Centro-Oeste

Dentre as 159 amostras analisadas neste estudo, provenientes da região Centro-Oeste, foi observada uma frequência maior de linhagens de DNAmT de ancestralidade indígena da ordem de 47,17%, enquanto que a africana foi de 35,85% e de linhagens europeias foi de 16,98% (Gráfico 2).

Com relação aos haplogrupos ameríndios, o que se apresentou mais frequente foi o haplogrupo C (18,87%), seguido pelos haplogrupos B (13,84%), A (9,43%) e D (5,03%). Nas linhagens africanas, o haplogrupo L apresentou frequência de 35,85% e o haplogrupo H (8,18%) foi o de maior representatividade entre as linhagens de origem europeia (Quadro 2).

Quadro 2 – Distribuição dos haplogrupos principais por região geográfica (Centro-Oeste, Norte e Nordeste) do Brasil

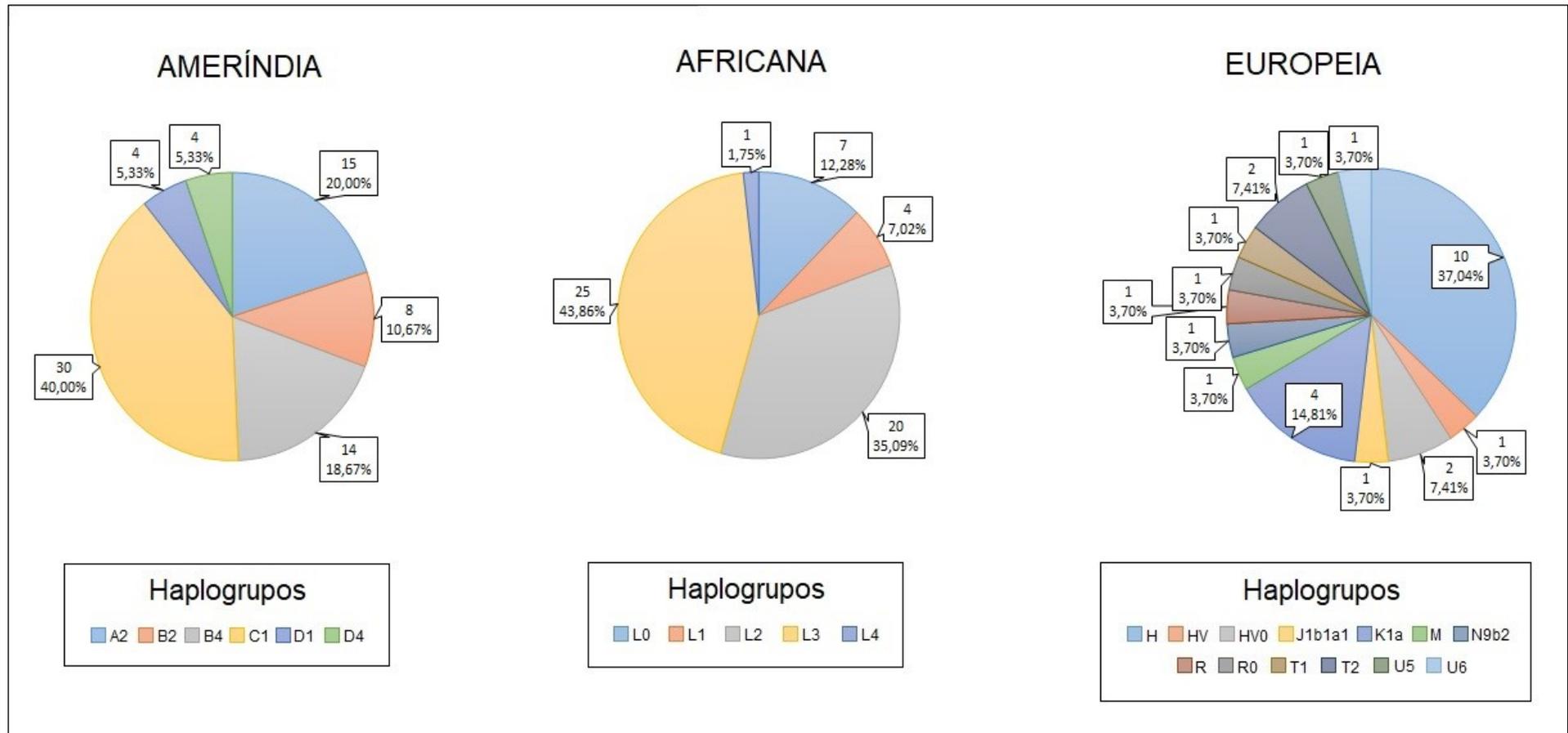
HG	Centro-Oeste (n = 159)		Norte (n = 154)		Nordeste (n = 100)	
	n	%	n	%	n	%
A	15	9,43	20	12,99	15	15
B	22	13,84	26	16,88	3	3
C	30	18,87	38	24,67	20	20
D	8	5,03	13	8,44	1	1
H	13	8,18	3	1,95	4	4
I	-	-	1	0,65	-	-
J	1	0,62	-	-	2	2
K	4	2,51	-	-	2	2
L	57	35,85	50	32,47	44	44
M	1	0,62	-	-	1	1
N	1	0,62	-	-		
R	2	1,26	1	0,65	3	3
T	3	1,89	-	-	1	1
U	2	1,26	1	0,65	3	3
W	-	-	1	0,65	-	-
X	-	-	-	-	1	1

Legenda. HG – haplogrupo.
Fonte: A autora, 2019.

Sob uma visão estratificada da distribuição dos haplogrupos de ascendência africana, foi observada maior ocorrência do haplogrupo L3 (43,86%) e subsequentemente dos haplogrupos L2 (35,09%), L0 (12,28%), L1 (7,02%) e L4 (1,75%).

Dentre as amostras pertencentes as linhagens europeias, o haplogrupo H (37,04%) foi o mais frequente, seguido pelos haplogrupos K1a (14,82%), HV0 e T2 (7,42% cada), sendo menos frequentes os haplogrupos HV, J1b1a1, M, N9b2, R, R0, T1, U5 e U6, cada um na proporção de 3,7%. Toda distribuição da origem dos haplogrupos encontrados na região Centro-Oeste, de acordo com as linhagens ancestrais, encontram-se discriminados a seguir no Gráfico 3:

Gráfico 3 – Frequência dos haplogrupos do DNAmT de acordo com a linhagem ancestral da região Centro-Oeste do Brasil



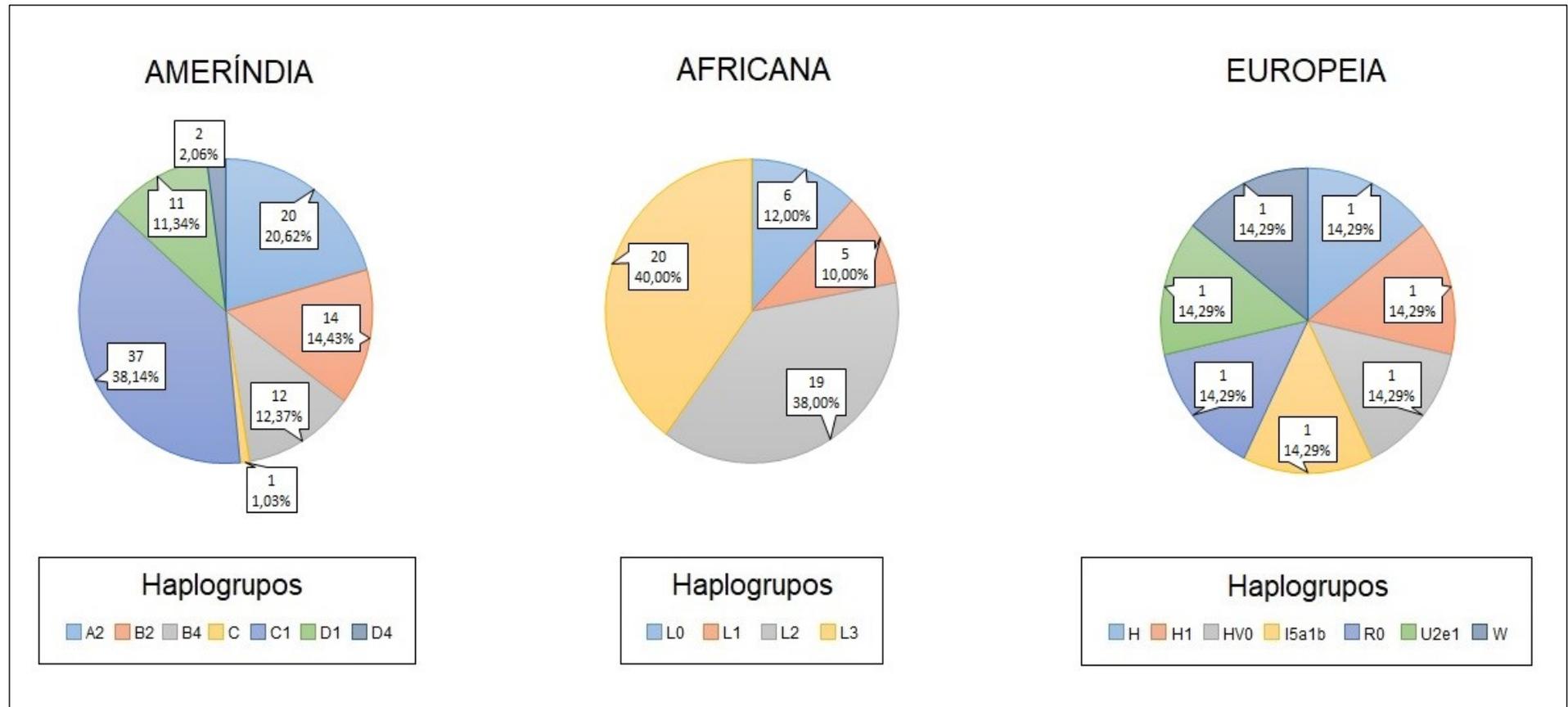
4.2.2 Região Norte

A análise da região controle do DNAm das amostras provenientes da região Norte foi marcada pela forte presença de haplogrupos de origem ameríndia, perfazendo um total de 62,99% dos 154 indivíduos analisados, seguido por 32,47% de haplogrupos de origem africana e somente 4,54% de europeus. Foi observado como mais frequente o haplogrupo C1 (38,14%) e o menos frequente o haplogrupo principal C (1,03%), conforme discriminado no Gráfico 4.

Com relação à influência africana presente nesta região, dos 50 indivíduos encontrados, os haplogrupos L3 e L2 apresentaram praticamente as mesmas proporções (40% e 38%, respectivamente) e os de menor incidência foram os haplogrupos L0 (12%) e L1 (10%).

O menor grupo étnico classificado a partir das linhagens do DNAm encontradas na região Norte, no presente estudo, coube aos haplogrupos europeus, onde apenas sete indivíduos foram identificados, em proporções igualitárias de 14,29% dos haplogrupos H, H1, HV0, I5a1b, R0, U2e1 e W (um indivíduo de cada). O Gráfico 4 mostra as proporções dos haplogrupos encontrados.

Gráfico 4 – Frequência dos haplogrupos do DNAmT de acordo com a linhagem ancestral da região Norte do Brasil



Fonte: A autora, 2019.

4.2.3 Região Nordeste

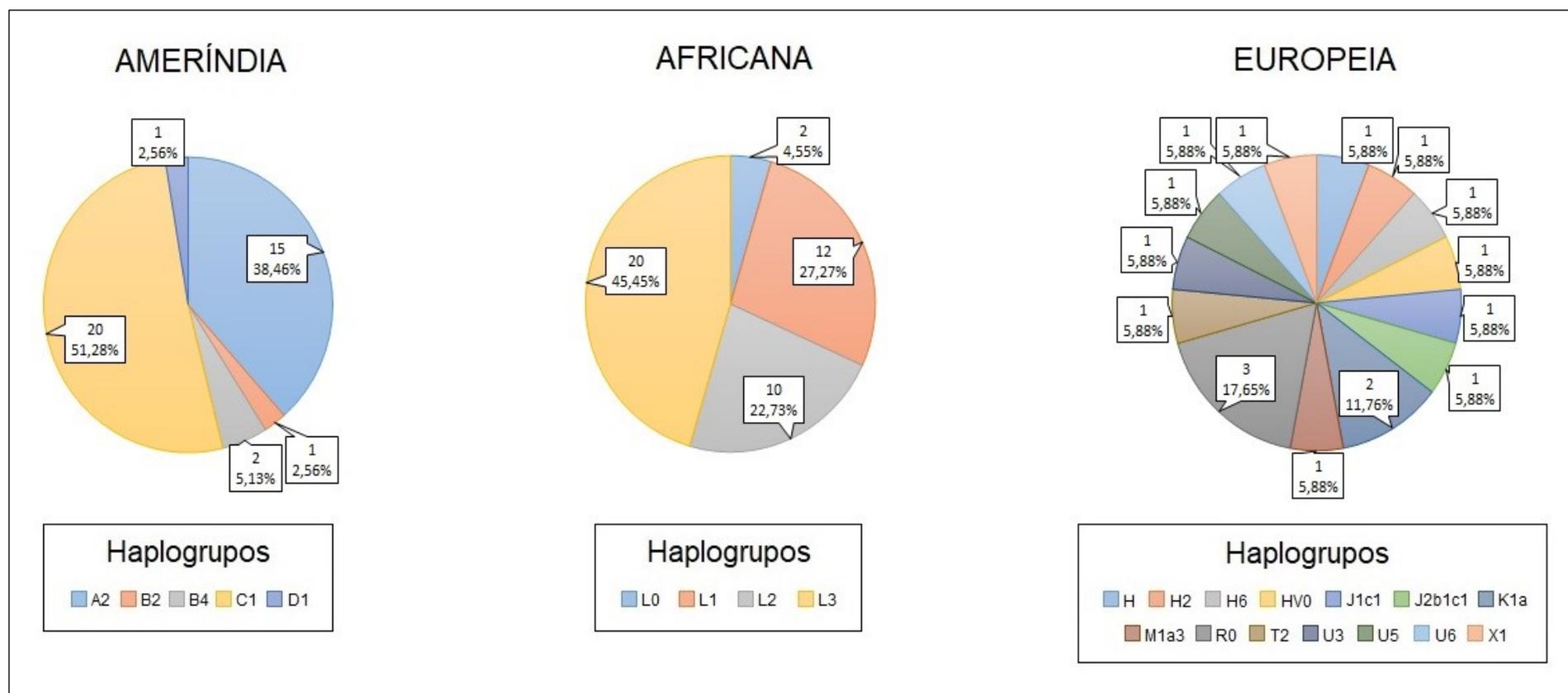
Diferente das regiões Centro Oeste e Norte, abordadas anteriormente, a contribuição étnica de maior ocorrência na região Nordeste foi a de africanos, com 44% do total de 100 amostras analisadas. Ameríndios e Europeus apresentaram proporções de 39% e 17%, respectivamente (Gráfico 2).

Entre os haplogrupos mais frequentes nas linhagens africanas a que se destacou em maior número foi a do haplogrupo L3, com 45,45%, posteriormente, as frequências observadas foram de 27,27% para o haplogrupo L1, 22,73% para o haplogrupo L2 e 4,55% em relação ao haplogrupo L0.

Pouco mais da metade das linhagens de ameríndios corresponderam ao haplogrupo C1 (51,28%), sucedido pelo haplogrupo A2 (38,46%) e pelos de menor frequência, os haplogrupos B4, com 5,13%, B2 e D1 ambos com 2,56%.

Todos os dados das frequências dos haplogrupos da região Nordeste estão compilados no Gráfico 5, mostrado a seguir:

Gráfico 5 – Frequência dos haplogrupos do DNAmT de acordo com a linhagem ancestral da região Nordeste do Brasil



Fonte: A autora, 2019.

4.3 Diversidade genética

4.3.1 Análises em nível intrapopulacional

Foram identificados 149 haplótipos únicos nas 159 amostras analisadas na região Centro Oeste, refletindo uma diversidade haplotípica de $0,9990 \pm 0,0009$, com uma alta média no número de diferenças nas comparações pareadas ($17,456094 \pm 7,796824$). Tais características foram também observadas nas demais regiões estudadas, onde na região Norte foram identificados 141 haplótipos diferentes de 154 analisados e, na região Nordeste, 93 indivíduos apresentaram diferentes haplótipos dos 100 analisados. Os índices de diversidade haplotípica nas regiões Norte e Nordeste foram proporcionalmente semelhantes com $0,9985 \pm 0,0010$ e $0,9984 \pm 0,0018$ e os números médios de diferenças pareadas foram de $18,567948 \pm 8,275171$ e $19,417374 \pm 8,664876$, respectivamente (Tabela 7). Os haplótipos compartilhados entre os indivíduos podem ser observados nas listas completas dos haplótipos de cada região geográfica do presente estudo nos Anexos 1, 2 e 3.

Ao comparar os índices de diversidade das populações estudadas neste trabalho com as populações do Espírito Santo, Rio de Janeiro e São Paulo nota-se que há concordância entre os mesmos. Apenas o Estado de Santa Catarina, comparado com todas as demais populações, mostra uma menor diversidade (Tabela 7).

Tabela 7 – Índices de diversidade molecular baseadas nas sequências da região controle do DNAm

Regiões/Estados	N	Haplótipos únicos	H	NMDP
Centro-Oeste*	159	149	0,9990 +/- 0,0009	17,456094 +/- 7,796824
Norte*	154	141	0,9985 +/- 0,0010	18,567948 +/- 8,275171
Nordeste*	100	93	0,9984 +/- 0,0018	19,417374 +/- 8,664876
ES (Sanches, 2014)	95	91	0,9991 +/- 0,0017	17,732811 +/- 7,943552
RJ (Simão, 2018)	205	194	0,9994 +/- 0,0006	18,590770 +/- 8,273874
SC (Palencia, 2010)	80	64	0,9940 +/- 0,0032	15,678481 +/- 7,070788
SP (Prieto, 2011)	142	135	0,9992 +/- 0,0010	17,134252 +/- 7,663550

Legenda: (*) populações do presente estudo; H – diversidade haplotípica; NMDP – número médio de diferenças pareadas.

Fonte: A autora, 2019.

O Quadro 3 mostra resultados obtidos após o uso da funcionalidade *EMPcheck*, da base de dados EMPOP, onde inserções, transversões e deleção novas foram apontadas. A maioria das alterações foi do tipo transversão, com oito ocorrências novas. O número total de variações polimórficas por região pode ser observado na Tabela 8.

Quadro 3 – Variações nucleotídicas da região controle do DNAm, destacadas pela ferramenta “*EMPcheck*”, de indivíduos das regiões Centro-Oeste, Norte e Nordeste do Brasil

Amostras	Haplogrupos	Deleção nova	Inserções novas	Transversões novas
CE9	C1	64delC	-	-
DF22	C1b	-	16188.1C	C16026A C16248A
MS26	C1b	-	-	C16248A
RR13	C1b	-	287.1C	A283C
TO14	I5a1b	-	-	C494A
DF2	L0a1b	-	-	C261A
GO34	L2c2b1b	-	-	C16264G
AL9	M1a3	-	-	A554T

Fonte: A autora, 2019.

Tabela 8 – Frequências absolutas da região controle do DNAm das variantes polimórficas encontradas nas regiões Centro-Oeste, Norte e Nordeste

	Centro-Oeste	Norte	Nordeste	Média	DP
Transições	178	163	146	162,3333	22,62742
Transversões	23	23	17	21	4,242641
Substituições	201	186	163	183,3333	26,87006
Indels	27	34	24	28,33333	2,12132

Fonte: A autora, 2019.

4.3.2 Análises em nível interpopulacional

A fim de obter maior robustez nas análises estatísticas, as amostras do presente estudo foram agrupadas de acordo com as divisões geográficas por região, tendo em vista que o número de indivíduos por Estado foi reduzido. As comparações entre as populações do presente estudo e as populações do Espírito Santo, Rio de Janeiro, Santa Catarina e São Paulo foram realizadas levando-se em consideração toda a região controle (16024-576). Não foram observadas diferenças significativas nas comparações pareadas (*pairwise* F_{ST}) entre nenhuma das populações

comparadas no referido teste, tendo em vista que todos os valores de F_{ST} observados se mostraram abaixo de 0,05. Da mesma forma, com relação aos valores de p , não foram observadas diferenças significativas entre os Estados ao compará-los separadamente entre si, com exceção de Santa Catarina que revelou diferenças estatisticamente significantes entre todas as populações usadas nos testes de comparações pareadas (Tabela 9).

Tabela 9 – Matriz de distâncias genéticas entre as populações das regiões Centro-Oeste (CO), Norte (N), Nordeste (NE) e as populações de outros estados dos Estados do Espírito Santo (ES), Rio de Janeiro (RJ), Santa Catarina (SC) e São Paulo (SP)

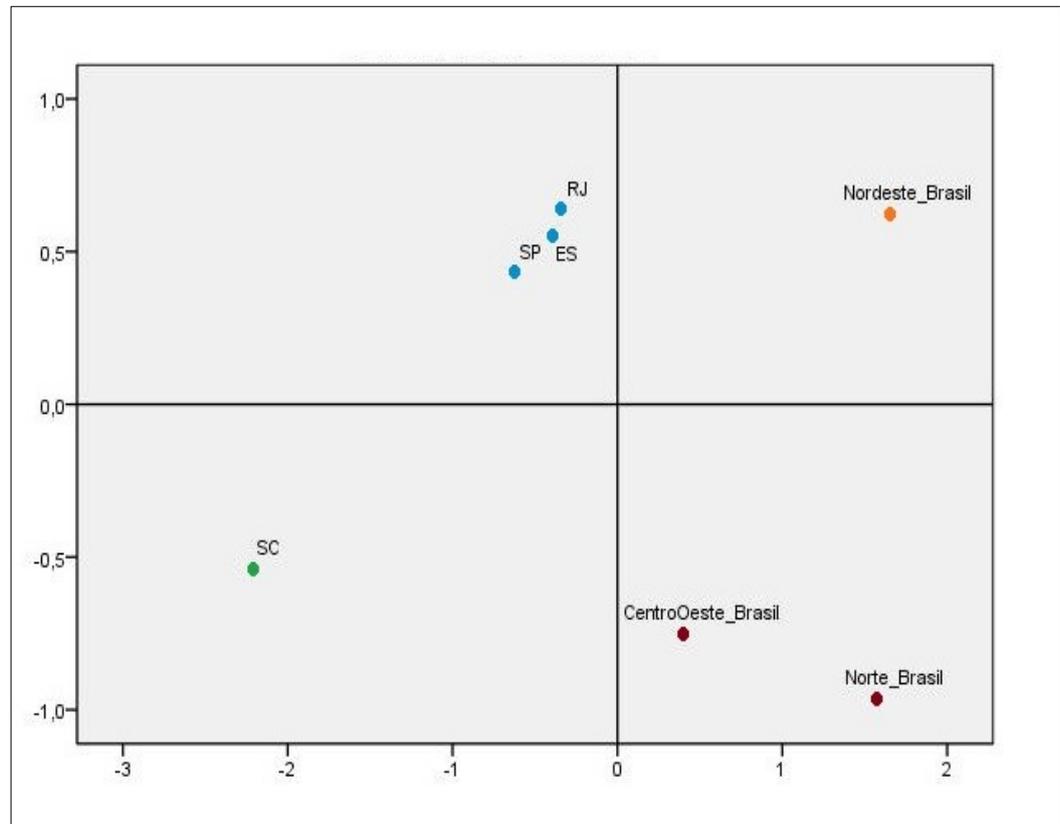
Regiões/ Estados	CO	N	NE	ES	RJ	SC	SP
CO ¹	*	0.14286	0.00208	0.00485	0.00010	0.00000	0.00267
N ¹	0,00222	*	0.00663	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
NE ¹	0,01193	0,01050	*	0.00178	0.00059	0.00000	0.00000
ES ²	0,00947	0,02462	0,01526	*	0.52361	0.00030	0.71310
RJ ³	0,01148	0,02424	0,01442	0,00054	*	0.00030	0.22424
SC ⁴	0,02567	0,04659	0,05038	0,01718	0,01813	*	0.00010
SP ⁵	0,00893	0,02570	0,02324	0,00168	0,00115	0,01733	*

Legenda: Acima da diagonal estão os valores de diferenciação de p obtidos para 10100 permutações, aplicada a correção de Bonferroni ($p \leq 0,002381$); Abaixo da diagonal estão os valores de F_{ST} . ¹ populações do presente estudo; ² Sanches *et al.*, 2014; ³ Simão *et al.*, 2018; ⁴ Palencia *et al.*, 2010; ⁵ Prieto *et al.*, 2011.

Fonte: A autora, 2019.

O mapeamento em três dimensões das distâncias genéticas entre as populações comparadas na Tabela 9 foi realizado através do teste de escalonamento multidimensional (MDS – *multidimensional scaling*), por meio do programa STATISTICA (*Data Analysis Software System*) versão 8.0, StatSoft Inc. (representação gráfica espacial plotada no Gráfico 6). A análise do gráfico revelou um agrupamento entre as populações do Sudeste (RJ, SP e ES), com nítida separação das populações do Nordeste, Santa Catarina, Norte e Centro-Oeste entre si.

Gráfico 6 – Plotagem MDS conforme a distância genética (F_{ST}) entre as populações de cinco regiões do Brasil baseada na diferenciação de haplótipos da região controle do DNAm



Fonte: A autora, 2019.

5 DISCUSSÃO

Os estudos acerca da ancestralidade genética a partir da análise do DNAm em populações brasileiras vem sendo desenvolvidos ao longo das últimas décadas, com maior foco em indivíduos provenientes das regiões Sudeste, Sul e Nordeste. Contudo, ainda há escassez, ou ausência de dados nas regiões Norte e Centro-Oeste, respectivamente. Desta forma, destacamos a relevância do presente trabalho, o qual se caracteriza como sendo o primeiro estudo abrangendo a região Centro-Oeste.

No caso da região Norte, foram identificados estudos considerando apenas a região HVI, outros incluindo as regiões HVI e HVII, alguns estudos com base em marcadores *Indels* e, ainda, estudos com foco em populações específicas de nativos indígenas (Alves-Silva *et al.*, 2000; Feio-dos-Santos *et al.*, 2006; Carvalho *et al.*, 2008; Lins *et al.*, 2010; Francez *et al.*, 2012; Manta *et al.*, 2013; Mendes-Júnior e Simões, 2014). Foram observados também estudos que reportaram análises em populações constituídas somente por indivíduos pertencentes a grupos socioeconomicamente mais favorecidos. Outra observação relevante é a representatividade de uma população dentro de um espaço geográfico, como visto em alguns estudos nos quais a análise de apenas um ou dois Estados foi reportada como característica de uma região como um todo, o que pode gerar um desvio para o predomínio de determinada ascendência étnica (Alves-Silva *et al.*, 2000; Pena *et al.*, 2011).

As amostras do presente estudo foram selecionadas aleatoriamente, seguindo apenas como critério de inclusão a naturalidade dos indivíduos. A procedência das amostras por Estado e suas respectivas quantidades estão discriminadas na Tabela 2 e a distribuição geográfica das mesmas pode ser visualizada na Figura 12.

A alta frequência de linhagens ameríndias na região Norte, observada no presente estudo, corrobora os dados de Alves-Silva e colaboradores (2000), os quais analisaram as regiões HVI e HVII em 48 indivíduos dos Estados do Amazonas, Pará, Acre e Rondônia, e encontraram 54% de ameríndios. Entretanto, as demais proporções são discordantes, pois as frequências de africanos (15%) e de europeus (31%) foram totalmente distintas do trabalho em questão, que apresentou as

respectivas proporções de 32,47% e 4,54%. Feio-dos-Santos (2006) analisou a região HVI de 49 indivíduos da região Norte, porém todos nascidos na cidade de Santarém, no Estado do Pará. Houve também concordância com os resultados do presente estudo, com maior predominância de ameríndios (61,22%), em seguida a origem africana (32,65%) e com frequência menor de europeus (4,08%). Embora, com um número reduzido de amostras analisadas, ao compararmos estes dados com os resultados dos 31 indivíduos procedentes do estado do Pará, no presente estudo, as frequências das linhagens mitocondriais foram praticamente idênticas (61,29% de ameríndios, 32,26% de africanos e 6,45% de europeus) (Tabela 10).

Tabela 10 – Frequência de haplogrupos em estudos da região Norte do Brasil

Regiões/Estados	Ameríndios	Africanos	Europeus
	%	%	%
Norte	62,99	32,47	4,54
AM, PA, AC, RO (Alves-Silva <i>et al.</i> , 2000)	54,00	15,00	31,00
PA (Feio-dos-Santos <i>et al.</i> , 2006)	61,22	32,65	4,08
AM, MA, AP (Carvalho <i>et al.</i> , 2008)	46,54	50,31	1,89

Fonte: A autora, 2019.

Outro estudo de ancestralidade realizado com 28 SNPs (Lins *et al.*, 2010) em uma população com 40 indivíduos da região Norte do Brasil, mostrou resultados diferentes com alta proporção relativa quanto às linhagens europeias (71,1%) e consequentemente baixas frequências de africanos (18,2%) e de ameríndios (10,7%). Da mesma forma, resultados contrários foram observados por Pena e colaboradores (2011) ao analisar um painel de 40 *Indels* em indivíduos selecionados de acordo com sua auto declaração étnica (brancos, pardos e negros) e oriundos das regiões Norte, Nordeste, Sudeste e Sul do país. Tal estudo revelou alta frequência de indivíduos de origem europeia (69,7%), seguida por africanos (10,9%) e ameríndios (19,4%) na população do Estado do Pará. Cabe ressaltar que no citado trabalho, os testes foram conduzidos como sendo referentes às regiões Norte,

Nordeste, Sudeste e Sul do país. Entretanto, somente um ou dois Estados foram analisados em cada região, o que não constitui uma representatividade fidedigna das populações nestes respectivos espaços geográficos.

A escassez de dados relativos à região Norte, tendo como base a análise completa da região controle do DNAm e, ainda, a adoção de critérios diversos na seleção do universo amostral, conforme mostrado nos trabalhos referenciados acima, denotam certa dificuldade nas comparações dos resultados com os do presente estudo. Apesar disso, é possível observar que os dados aqui apresentados estão em consonância com a história do povoamento da região Norte na época do período colonial. Diversos fatores histórico-sociais contribuíram para a reduzida representatividade do negro na Amazônia, como a proibição do tráfico, a abolição da escravidão, o início de uma imigração organizada e o êxodo nordestino para aquela região. Além disso, o negro não tinha muita representatividade, em termos quantitativos, para constituir a base da mistura étnica na região Amazônica, através do cruzamento com o branco europeu (Salles, 1971). A marcante presença de nativos indígenas em toda região Amazônica se reflete até os dias atuais, com o predomínio de ancestralidade ameríndia evidenciada no presente estudo (62,99%).

Os resultados aqui apresentados constituem o primeiro trabalho com dados de linhagens mitocondriais da região Centro-Oeste do país, conseqüentemente, análise comparativa com dados de outros estudos foi prejudicada. Manta e colaboradores (2013) em uma análise com 46 marcadores *Indels* de ancestralidade em populações das cinco macrorregiões do país, encontraram no Estado do Mato Grosso do Sul, 15,3% de ameríndios, 25,6% de africanos e uma alta proporção de europeus (58,8%). Tais dados, embora com marcadores diferentes dos analisados no presente trabalho, foram discordantes dos gerados em nosso estudo, no qual a maior frequência foi de ameríndios (47,17%), levando em consideração que os quatro Estados da região foram incluídos nas análises.

A composição étnica da região Nordeste, quando é considerada a análise do DNAm, costuma ser reportada com maior frequência de linhagens africanas em relação às ameríndias (Alves-Silva *et al.*, 2000; Barbosa, *et al.*, 2008), compatível com o presente estudo. Todavia, Schaan e colaboradores (2017), ao analisarem as três regiões hipervariáveis do DNAm em uma população da região Nordeste, encontraram resultados divergentes, com predominância de ancestralidade ameríndia (43,5%), seguida por 37,8% de ancestralidade africana e 16,6% de

européus. No presente estudo as proporções relativas dos três grupos étnicos foram de 44% de africanos, 39% de ameríndios e 17% de europeus. Mesmo com diferenças no universo amostral entre os dois estudos, as frações são proporcionalmente muito semelhantes. Contudo, a inversão nas frequências de ameríndios e africanos pode ser interpretada devida a uma não homogeneidade quanto ao número de amostras analisadas por Estado, ao avaliar o trabalho de Schaan e colaboradores (2007). No referido trabalho, embora quase todos os Estados da região Nordeste tenham sido incluídos (com exceção do Maranhão), há uma grande desproporção na distribuição das amostras analisadas por Estado. Apenas sete amostras procedentes do Estado da Bahia e quatro no Estado do Sergipe foram estudadas. No presente estudo, sete dos nove Estados que compõem a região Nordeste foram analisados, mas com distribuição homogênea dos mesmos quanto ao número de amostras (Tabela 11).

Tabela 11 – Frequência de haplogrupos em estudos da região Nordeste do Brasil

Regiões/Estados	Ameríndios	Africanos	Europeus
	%	%	%
Nordeste	39,00	44,00	17,00
AL (Barbosa <i>et al.</i> , 2008)	33,00	44,00	21,00
PE (Alves-Silva <i>et al.</i> , 2000)	22,00	44,00	34,00
Nordeste (Schaan <i>et al.</i> , 2017)	43,5	37,8	16,6

Fonte: A autora, 2019.

Outro ponto importante a ser ressaltado com relação à comparação dos dados do estudo de Schaan e colaboradores (2017) com os nossos dados, é que o Estado da Bahia, especificamente, foi um dos locais que tiveram forte presença de negros oriundos do mercado escravista da África Ocidental na época da colonização do Brasil. Bahia, Pernambuco e Rio de Janeiro, inicialmente, receberam os maiores contingentes de escravos africanos, devido à presença dos portos. Estima-se em

torno de 3 milhões de africanos inseridos no país a partir da segunda metade do século XVI (IBGE, 2007). Já o Estado do Maranhão enfrentou dificuldades para desenvolver a capitania logo de início, a qual era dependente de mão de obra escrava africana para a ascensão econômica. Somente após a segunda metade do século XVII houve um aumento na introdução do africano no contexto do desenvolvimento das áreas do Maranhão e do Pará que, até então, tinham uma presença muito maior de índios nativos em integração com os colonos portugueses (Boxer, 1969; Salles, 1971). Desta forma, a pouca representatividade amostral no estudo referenciado (Schaan *et al.*, 2017), pode levar à uma interpretação não fidedigna da região como um todo.

A alta diversidade haplotípica nas regiões Centro Oeste, Norte e Nordeste em relação às regiões Sul e Sudeste pode ser explicada com base no contexto histórico da colonização do Brasil, devido às diferentes influências populacionais que cada região recebeu à época. O Nordeste do país foi a porta de entrada dos colonizadores portugueses, que posteriormente trouxeram um grande contingente de escravos africanos para toda a costa atlântica, com destaque para os Estados de Pernambuco, Bahia e Rio de Janeiro (Boxer, 1969; Salles, 1971; Schwartz, 1988; IBGE, 2007).

Com relação aos sub-haplogrupos africanos identificados nas três regiões analisadas no presente trabalho (Tabela 12), foi observada uma maior frequência de L2a e L3e nas regiões Centro Oeste (28,7% e 26,32%) e Norte (30,0% e 18,0%), enquanto que na região Nordeste os sub-haplogrupos mais frequentes foram L1c e L3e (27,27% e 20,45%). Como já identificado em estudos anteriores sobre as regiões Nordeste e Sudeste, conhecidamente, populações com maior ascendência de linhagens africanas no Brasil apresentam os sub-haplogrupos L1c e L3c como os mais frequentes (Alves-Silva *et al.*, 2000; Salas *et al.*, 2004; Barbosa *et al.*, 2008; Schaan *et al.*, 2017; Simão *et al.*, 2018), sendo estes também mais frequentes no Oeste da África (Beleza *et al.*, 2005), o que concorda com os registros históricos que versam sobre a procedência dos cativos africanos (e característicos dos grupos linguísticos Bantu) trazidos para o Brasil na época da colonização (Boxer, 1969; Schwartz, 1988; Alves-Silva *et al.*, 2000; Bandelt *et al.*, 2001; IBGE, 2017). Beleza e colaboradores (2005) também encontraram, predominantemente, os sub-haplogrupos L1c (24,77%) e L3e (22,02%) em indivíduos africanos oriundos da província de Cabinda, na República de Angola (Quadro 4).

Sobre a maior frequência de sub-haplogrupos L2a encontrados nas regiões Centro-Oeste e Norte do Brasil no presente estudo, pesa novamente a dificuldade para realizar uma análise comparativa devido à escassez de dados publicados sobre a região Norte e à ausência de dados sobre a região Centro-Oeste. Como exemplo de estudos anteriores que corroboram os resultados aqui apresentados, é possível citar o trabalho de Carvalho e colaboradores (2008), que, ao determinarem os haplogrupos de 80 haplótipos africanos (região HVI) de indivíduos oriundos de 5 comunidades quilombolas distribuídas nos Estados do Pará, Maranhão e Amapá (Quadro 4), encontraram maior ocorrência de L2a (25,00%) e L3e (22,50%) como segundo mais frequente. Já em outro estudo realizado com 307 indivíduos de 16 diferentes populações indígenas, pertencentes ao grupo linguístico Bantu, do sudeste da África, dos 12 sub-haplogrupos de linhagens africanas encontrados em 306 indivíduos, o mais frequente foi também L2a (29,41%), seguido pelo L1a (28,43%) (Salas *et al.*, 2002).

O haplogrupo L2, provavelmente originário da África Ocidental, mas atualmente encontra-se amplamente distribuído por todo continente africano (Salas *et al.*, 2002; Rosa e Brehm, 2011; Silva *et al.*, 2015; Johnson *et al.*, 2015), o que torna difícil a caracterização geográfica de grupos populacionais que apontam este haplogrupo como maior fração. Cinco linhagens caracterizam o haplogrupo L2, são elas: L2a, L2b, L2c, L2d e L2e, das quais a mais comum é o L2a (Salas *et al.*, 2002). Em populações de ascendência africana nos Estados Unidos também há maior presença do sub-haplogrupos L2a (23,13%), conforme relatado por Johnson (2015) em estudo realizado com 343 amostras procedentes de 13 cidades do país, das quais 294 foram classificadas como pertencentes ao macro-haplogrupo L (Quadro 4). Tais dados concordam com os registros históricos a respeito do tráfico de escravos africanos para as Américas vindos principalmente da África Ocidental.

Quadro 4 – Frequências dos sub-haplogrupos de linhagem africana observados nas populações do presente estudo (Centro-Oeste, Norte e Nordeste do país), Rio de Janeiro (Simão *et al.*, 2018), Alagoas (Alves-Silva *et al.*, 2008), Pará, Maranhão e Amapá (Carvalho *et al.*, 2008), grupos linguísticos Bantu do Sudeste da África (Salas *et al.*, 2002), Angola (Beleza *et al.*, 2005 e Afroamericanos, EUA (Johnson *et al.*, 2015)

HG	Centro-Oeste		Norte		Nordeste		RJ (Simão <i>et al.</i> , 2018)		AL (Alves-Silva <i>et al.</i> , 2008)		PA, MA, AP (Carvalho <i>et al.</i> , 2008)		Bantu, Sudeste da África (Salas <i>et al.</i> , 2002)		Angola, África (Beleza <i>et al.</i> , 2005)		Africanos, EUA (Johnson <i>et al.</i> , 2015)	
	n = 57	%	n = 50	%	n = 44	%	n = 86	%	n = 73	%	n = 80	%	n = 306	%	n = 109	%	n = 294	%
L0a	7	12,28	6	12	2	4,55	10	11,63	-	-	2	2,50	-	-	14	12,84	-	-
L0d	-	-	-	-	-	-	2	2,33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L1a	-	-	-	-	-	-	-	-	2	2,74	-	-	87	28,43	-	-	-	-
L1b	-	-	-	-	-	-	3	3,49	4	5,48	10	12,50	4	1,31	3	2,75	35	11,9
L1c	4	7,02	5	10	12	27,27	21	24,42	19	26,03	8	10,00	17	5,56	27	24,77	30	10,2
L2a	16	28,07	15	30	7	15,91	9	10,47	12	16,44	20	25,00	90	29,41	5	4,59	68	23,13
L2b	1	1,75	2	4	2	4,55	4	4,65	5	6,85	1	1,25	4	1,31	7	6,42	-	-
L2c	3	5,27	2	4	1	2,27	3	3,49	3	4,11	3	3,77	2	0,65	-	-	-	-
L3	-	-	1	2	-	-	-	-	-	-	2	2,50	4	1,31	-	-	-	-
L3b	5	8,77	3	6	3	6,82	3	3,49	2	2,74	4	5,00	9	2,94	5	4,59	-	-
L3d	1	1,75	2	4	2	4,55	8	9,3	-	-	5	6,25	21	6,86	5	4,59	66	59,93
L3e	15	26,32	9	18	9	20,45	14	16,28	20	27,4	18	22,50	48	15,67	24	22,02	-	-
L3f	3	5,27	3	6	5	11,36	8	9,3	6	8,22	2	2,50	8	2,61	14	12,84	-	-
L3k	1	1,75	2	4	1	2,27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L4	1	1,75	-	-	-	-	1	1,16	-	-	-	-	-	-	-	-	2	0,68

Legenda: HG – haplogrupo.

Nota: As populações do presente estudo (Centro-Oeste, Norte e Nordeste do Brasil) estão preenchidas com a cor cinza; as demais populações utilizadas para comparação estão preenchidas com a cor azul; em negrito, estão destacadas os dois sub-haplogrupos de maior frequência em cada população.

Fonte: A autora, 2019.

Ao estratificar as linhagens ameríndias determinadas no presente estudo, foram observados os sub-haplogrupos C1 (40,0%) e B4 (18,67%) na região Centro Oeste, C1 (38,14%) e B2 (14,43%) na região Norte e C1 (51,28%) e A2 (38,46%) na região Nordeste (Quadro 5). Os quatro principais haplogrupos A, B, C e D são exclusivamente encontrados no continente Pan-americano (Tamm *et al.*, 2007), como fundadores destas respectivas linhagens (Tamm *et al.*, 2007; Perego *et al.*, 2010). O sub-haplogrupos C1 foi o mais frequente nas três regiões estudadas no presente trabalho, diferente do estudo de Simão e colaboradores (2018), que em uma população do Estado do Rio de Janeiro, encontraram o sub-haplogrupos A2 (30,19%) como o mais frequente seguido do sub-haplogrupos C1 com 26,42%. Em Santa Catarina, no estudo de Palencia e colaboradores (2010) foi encontrada maior frequência dos haplogrupos B e C (ambos com 8,75%). Já, em um estudo com a população de Alagoas (Barbosa *et al.*, 2008), foram observados os haplogrupos principais A, B e C com proporções semelhantes (32,73%, 30,91% e 29,10%, respectivamente), sendo o menos frequente o haplogrupo D (7,27%). Na região Norte, Feio dos Santos (2006), ao analisar indivíduos oriundos do Estado do Pará, verificou maior proporção dos haplogrupos A e C (30% cada), conforme mostrado no Quadro 5. Contudo, não foi possível verificar as proporções dos sub-haplogrupos nos estudos citados devido à ausência de tais dados.

Quadro 5 - Frequências dos haplogrupos e sub-haplogrupos de linhagem ameríndia observados nas populações do presente estudo (Centro-Oeste, Norte e Nordeste do país), Rio de Janeiro (Simão *et al.*, 2018), Santa Catarina (Palencia *et al.*, 2010), Alagoas (Alves-Silva *et al.*, 2008) e Pará (Feio-Dos-Santos *et al.*, 2006)

HG	Centro-Oeste		Norte		Nordeste		RJ (Simão <i>et al.</i> , 2018)		SC (Palencia <i>et al.</i> , 2010)		AL (Barbosa <i>et al.</i> , 2008)		PA (Feio-Dos-Santos <i>et al.</i> , 2006)	
	n = 75	%	n = 97	%	n = 39	%	n = 86	%	n = 17	%	n = 55	%	n = 30	%
A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	18	32,73	9	30,00
A2	15	20,00	20	20,62	15	38,46	16	30,19	-	-	-	-	-	-
B	-	-	-	-	-	-	-	-	7	8,75	17	30,91	7	23,33
B2	8	10,67	14	14,43	1	2,56	8	15,09	-	-	-	-	-	-
B4	14	18,67	12	12,37	2	5,13	12	22,64	-	-	-	-	-	-
C	-	-	1	1,03	-	-	-	-	7	8,75	16	29,10	9	30,00
C1	30	40,00	37	38,14	20	51,28	14	26,42	-	-	-	-	-	-
D1	4	5,33	11	11,34	1	2,56	2	3,77	-	-	-	-	-	-
D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	7,27	5	16,67
D4	4	5,33	2	2,07	-	-	1	1,89	-	-	-	-	-	-

Fonte: A autora, 2019.

As análises das distâncias genéticas (F_{ST}) por pares de populações analisadas no estudo atual, apresentadas na Tabela 9, incluíram comparações com as populações de outros estudos nos Estados do Espírito Santo (Sanchez *et al.*, 2014), Rio de Janeiro (Simão *et al.*, 2018), São Paulo (Prieto *et al.*, 2011) e Santa Catarina (Palencia *et al.*, 2010). Os resultados obtidos mostraram que, com relação ao teste de não diferenciação, as populações comparadas no presente estudo apresentaram pouco distanciamento entre si, tendo em vista que todos os valores de F_{ST} estão abaixo de 0,05, deixando evidente que, apesar de intensos cruzamentos interétnicos, estes conservaram suas características genéticas ancestrais ao longo das gerações. Ao comparar os valores de p das regiões estudadas com as demais populações selecionadas dos outros estudos, há diferença significativa na maioria das comparações, o que pode ser explicado pela história da formação da nossa população, visto que os processos de povoamento tiveram diferentes aspectos e influências em determinadas regiões no país. Entretanto, não foram observadas diferenças significativas nas comparações entre a região Norte e a região Nordeste e da região Norte com Centro Oeste. Da mesma forma, nas comparações com os Estados das demais regiões do país, não houve diferença significativa entre a região Centro Oeste e o Estado do Espírito Santos. Por fim, também não foram evidenciadas diferenças significativas entre os Estados analisados da região Sudeste.

Os resultados do escalonamento multidimensional (MDS) mostraram dados esperados ao analisarmos o maior componente étnico de cada grupo populacional analisado, sendo novamente corroborados pelos antecedentes históricos referentes às influências recebidas no período da colonização do Brasil. A separação das populações agrupadas do Sudeste (RJ, SP e ES), de Santa Catarina e das populações aqui estudadas das regiões Centro Oeste, Norte e Nordeste, foi nitidamente caracterizada no Gráfico 6, fazendo jus a cada ascendência ancestral majoritária em cada umas das referidas populações comparadas.

Os dados genéticos gerados em diversos estudos, não somente nos resultantes do estudo aqui apresentado, permitem compreender de forma mais ampla todo processo de formação da população brasileira em conjunto com os registros históricos desde a época do descobrimento. As diferentes características herdadas, devido à influência de outros povos durante o período colonial, são resultantes de interações, em diferentes contextos, dos europeus com os nativos

indígenas e, posteriormente, com os africanos, nas cinco regiões geopolíticas do Brasil. Inicialmente, os colonizadores europeus (principalmente portugueses e espanhóis), que com o passar do tempo se tornaram imigrantes, foram responsáveis por iniciar o processo de miscigenação através dos cruzamentos com mulheres indígenas, em um primeiro momento e, em seguida, com mulheres africanas, cujos resultados estão presentes no perfil de ancestralidade do nosso país.

Não obstante os resultados do presente estudo possam contribuir para a ampliação dos dados da população brasileira de forma global, com informações geradas a partir de populações para as quais não havia estudos, ou havia escassez de dados relativos as linhas mitocondriais, permanece a importância da realização de novas análises com vistas à agregar maior robustez aos bancos de dados e aprofundar nosso conhecimento acerca da constituição genética brasileira.

CONCLUSÃO

- a) Foram encontrados 149 haplótipos diferentes na região Centro Oeste, 141 na região Norte e 93 na região Nordeste num total de 159, 154 e 100 haplótipos de cada região, respectivamente. Uma alta diversidade haplotípica foi observada nas três regiões estudadas (Centro Oeste: 0,9990 +/- 0,0009; Norte: 0,9985 +/- 0,0010 e; Nordeste: 0,9984 +/- 0,0018).
- b) As proporções relativas das linhagens maternas com base na determinação dos haplogrupos foi de 62,99% de ameríndios, 32,47% de africanos e 4,54% de europeus na região Norte; 47,17% de ameríndios, 32,85% de africanos e 16,98% de europeus na região Centro Oeste e; 39% de ameríndios, 44% de africanos e 17% de europeus na região Nordeste. Estes dados estão alinhados com o contexto histórico da colonização do Brasil e de como se deu o processo de povoamento ao longo de cinco séculos passados;
- c) Distâncias genéticas significativas não foram observadas entre as populações das regiões Centro-Oeste, Norte e Nordeste, bem como com as populações da região Sudeste. A população de Santa Catarina apresentou moderada diferenciação genética apenas na comparação com a região Nordeste analisada no presente estudo, em consonância com as influências migratórias de europeus que marcaram mais acentuadamente a região Sul do país na época da colonização;
- d) Uma base de dados de 383 haplótipos foi construída para as regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste do Brasil, para fins de identificação de efetivos militares das Forças Armadas, a qual poderá contribuir para a expansão de dados já existentes das linhagens mitocondriais de povos da América do Sul.
- e) Foi construída a primeira base de dados de linhagens mitocondriais da região Centro-Oeste do Brasil.

f) Foi desenvolvida metodologia para sequenciamento da região controle completa do DNAm por PCR direta a partir de amostras armazenadas em matriz de papel de filtro tratada.

REFERÊNCIAS

- ALVES-SILVA, J. *et al.* The Ancestry of Brazilian mtDNA Lineages. **American Journal of Human Genetics**, v. 67, p. 444–461, 2000.
- ANDERSON, S. *et al.* Sequence and organization of the human mitochondrial genome. **Nature**, v. 290, n. 5806, p. 457–465, 1981.
- ANDREW, T. *et al.* A twin study of mitochondrial DNA polymorphisms shows that Heteroplasmy at multiple sites is associated with mtDNA variant 16093 but not with Zygosity. **PLoS ONE**, v. 6, n. 8, p. e22332, 2011.
- ANDREWS, R. M. Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. **Nature Genetics**, v. 23, p. 147, 1999.
- BAILEY, L. J.; DOHERTY, A. J. Mitochondrial DNA replication: a PrimPol perspective. **Biochemical Society Transactions**, v. 45, n. 2, p. 513–529, 2017.
- BALLANTYNE, K. N. *et al.* MtDNA SNP multiplexes for efficient inference of matrilineal genetic ancestry within Oceania. **Forensic Science International: Genetics**, v. 6, n. 4, p. 425–436, 2012.
- BALLARD, D. Forensic DNA Typing Protocols. In: **Forensic DNA Typing Protocols, Methods in Molecular Biology**. [s.l.: s.n.]. v. 1420, p. 143–155, 2016.
- BANDELT, H. J.; VAN OVEN, M.; SALAS, A. Haplogrouping mitochondrial DNA sequences in Legal Medicine/Forensic Genetics. **International Journal of Legal Medicine**, v. 126, n. 6, p. 901–916, 2012.
- BARBOSA, A. B. G. *et al.* Mitochondrial DNA Control Region Polymorphism in the Population of Alagoas State, North-Eastern Brazil. **Journal of Forensic Sciences**, v. 53, n. 1, p. 142–146, 2008.
- BAUM, B. D.; AVE, L. Reading a Phylogenetic Tree: The Meaning of Monophyletic Groups What an Evolutionary Tree Represents. **Nature education**, v. 1(1), n. 190, p. 1–7, 2008.
- BELEZA, S. *et al.* The genetic legacy of western Bantu migrations. **Human Genetics**, v. 117, p. 366–375, 2005.
- BENDALL, K. E.; SYKES, B. C. Length Heteroplasmy in the First Hypervariable Segment of the Human mtDNA Control Region. **American Journal of Human Genetics**, v. 57, p. 248–256, 1995.
- BERGER, C. *et al.* Evaluating sequence-derived mtDNA length heteroplasmy by amplicon size Analysis. **Forensic Science International: Genetics**, v. 5, p. 142–145, 2011.

BERNARDO, S. *et al.* MtDNA ancestry of Rio de Janeiro population, Brazil. **Molecular Biology Reports**, v. 41, n. 4, p. 1945–1950, 2014.

BHATTI, S. *et al.* Problems in Mitochondrial DNA forensics: while interpreting length heteroplasmy conundrum of various Sindhi and Baluchi ethnic groups of Pakistan. **Mitochondrial DNA Part A: DNA Mapping, Sequencing, and Analysis**, v. 29, n. 4, p. 501–510, 2017.

BODNER, M. *et al.* Rapid coastal spread of First Americans: Novel insights from South America's Southern Cone mitochondrial genomes. **Genome Research**, v. 22, p. 811–820, 2012.

BOTELHO, T. R. História da população brasileira: balanços e perspectivas. **Cadernos de História**, v.6, n. 7, p. 30–48, 2001.

BOXER, C. R. *O império colonial português (1415-1825)*, tradução: Inês Silva Duarte – São Paulo: Edições 70, 1969.

BRANDSTÄTTER, *et al.* Mitochondrial DNA control region sequences from Nairobi (Kenya): inferring phylogenetic parameters for the establishment of a forensic database. **International Journal of Legal Medicine**, v. 118, p. 294–306, 2004.

BRANDINI, S. *et al.* The Paleo-Indian Entry into South America According to Mitogenomes. **Molecular Biology and Evolution**, v. 35, n. 2, p. 299–311, 2018.

BROWN, W. M.; SHINE, J.; GOODMAN, H. M. Human mitochondrial DNA: Analysis of 7S DNA from the origin of replication. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 75, n. 2, p. 735–739, 1978.

BUTLER, J. M. *Forensic DNA Typing*. 2. ed. EUA: Academic Press, 2005.

CAMPBELL, M. C.; TISHKOFF, S. A. African genetic diversity: implications for human demographic history, modern human origins, and complex disease mapping. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, v. 9, p. 403–433, 2008.

CAMPBELL, M. C. *et al.* The peopling of the African continent and the diaspora into the new world. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 29, p. 120–132, 2014.

CANN, R. L.; STONEKING, M.; WILSON, A. C. Mitochondrial DNA and human evolution. **Nature**, v. 325, p. 31–36, 1987.

CARDENA, M. M. S. G. *et al.* Assessment of the Relationship between Self-Declared Ethnicity, Mitochondrial Haplogroups and Genomic Ancestry in Brazilian Individuals. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, p. e62005, 2013.

CARVALHO, B. M. *et al.* Mitochondrial DNA mapping of social-biological interactions in Brazilian Amazonian African-descendant populations. **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, n. 1, p. 12–22, 2008.

CHINNERY, P. F.; HUDSON, G. Mitochondrial genetics. **British Medical Bulletin**, v. 106, n. 1, p. 135–159, 2013.

- CHUNG-I LEE, J. et al. Investigation into length heteroplasmy in the mitochondrial DNA control region after treatment with bisulfite. **Journal of the Formosan Medical Association**, v. 115, p. 284–287, 2016.
- COBLE, M. D. *et al.* Mystery solved: The identification of the two missing Romanov children using DNA analysis. **PLoS ONE**, v. 4, n. 3, p. 1–9, 2009.
- CORNISH-BOWDEN, A. Nomenclature for incompletely specified bases in nucleic acid sequences: recommendations 1984. **Nucleic Acid Research**, v. 13, n. 9, p. 3021–3030, 1985.
- DIMAURO, S.; SCHON, E. A. Mitochondrial DNA mutations in human disease - American Journal of Medical Genetics - Wiley Online Library. **American journal of medical genetics**, v. 26, p. 18–26, 2001.
- ELLEGREN, H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. **Nature Reviews Genetics**, v. 5, p. 435–445, 2004.
- EXCOFFIER, L.; LAVAL G.; SCHNEIDER, S. Arlequin ver. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics Online**, v. 1, n. :47–50, 2005.
- EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. E. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources**, v. 10, n. 3, p. 564–567, 2010.
- FALKENBERG, M. Mitochondrial DNA replication in mammalian cells: overview of the pathway. **Essays in Biochemistry**, v. 62, p. 287–296, 2018.
- FAN, L., YAO Y-G. MitoTool: A web server for the analysis and retrieval of human mitochondrial DNA sequence variations. **Mitochondrion**, v. 11, p. 351–356, 2011.
- FEIO-DOS-SANTOS, A. C. *et al.* Nucleotide variability of HV-I in admixed population of the Brazilian Amazon Region. **Forensic Science International**, v. 164, p. 276–277, 2006.
- FORSTER, L. *et al.* Evaluating length heteroplasmy in the human mitochondrial DNA control region. **International Journal of Legal Medicine**, v. 124, n. 2, p. 133–142, 2010.
- FRANCEZ, P. A. C.; RIBEIRO-RODRIGUES, E. M.; SANTOS, S. E. B. Allelic frequencies and statistical data obtained from 48 AIM INDEL loci in an admixed population from the Brazilian Amazon. **Forensic Science International: Genetics**, v. 6, p. 132–135, 2012.
- FREGEL, R.; DELGADO, S. HaploSearch: A tool for haplotype-sequence two-way transformation. **Mitochondrion**, v. 11, n. 2, p. 366–367, 2011.
- FUNDAÇÃO NACIONAL DO ÍNDIO – FUNAI. Índios no Brasil, Quem são. Disponível em: <<http://www.funai.gov.br/index.php/indios-no-brasil/quem-sao>>. Acesso em: 28 dez. 2018.

- GILES, R. E. *et al.* Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 77, n. 11, p. 6715–6719, 1980.
- GILL, P. *et al.* Identification of the remains of the Romanov family by DNA analysis. **Nature Genetics**, v. 6, p. 130–135, 1994.
- GOMEZ, F. *et al.* Genetic Variation and Adaptation in Africa : implications for human evolution and disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 7, n. 6, p. 1–21, 2014.
- GREEN, R. E. *et al.* A Draft Sequence of the Neandertal Genome - Supporting Information. **Science**, v. 328, n. 5979, p. 710–722, 2010.
- GROUCUTT, H. S. *et al.* Rethinking the dispersal of Homo sapiens out of Africa. **Evolutionary Anthropology**, v. 24, n. 4, p. 149–164, 2015.
- HOLLAND, M. M. *et al.* MPS analysis of the mtDNA hypervariable regions on the MiSeq with improved enrichment. **International Journal of Legal Medicine**, v. 131, n. 4, p. 919–931, 2017.
- HOMBURGUER, J. R. *et al.* Genomic Insights into the Ancestry and Demographic History of South America. **PLoS Genetics**, v. 11, n. 12, p. 1–26, 2015.
- HUBER, N.; PARSON, W.; DÜR, A. Next generation database search algorithm for forensic mitogenome analyses. **Forensic Science International: Genetics**, v. 37, n. August, p. 204–214, 2018.
- INGMAN, M.; GYLLENSTEN, U. mtDB: Human Mitochondrial Genome Database, a resource for population genetics and medical sciences. **Nucleic Acid Research**, v. 34, Database issue, p. D749–D751, 2006.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE (Brasil). Brasil: 500 anos de povoamento. **Centro de Documentação e Disseminação de Informações**. Rio de Janeiro, 2007. 232 f.
- IRWIN, J. A. *et al.* Investigation of heteroplasmy in the human mitochondrial DNA control region: A synthesis of observations from more than 5000 global population samples. **Journal of Molecular Evolution**, v. 68, n. 5, p. 516–527, 2009.
- IVANOV, P. L. Mitochondrial DNA sequence heteroplasmy in the Grand Duke of Russia Georgij Romanov establishes the authenticity of the remains of Tsar Nicholas II. **Nature Genetics**, v. 12, p. 417–420, 1996.
- JEMT, E. *et al.* Regulation of DNA replication at the end of the mitochondrial D-loop involves the helicase TWINKLE and a conserved sequence element. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. 19, p. 9262–9275, 2015.
- JOHNSON, D. C. *et al.* Mitochondrial DNA diversity in the African American population. **Mitochondrial DNA**, v. 26, n. 3, p. 445–451, 2015.

JUST, R. S.; IRWIN, J. A.; PARSON, W. Mitochondrial DNA heteroplasmy in the emerging field of massively parallel sequencing. **Forensic Science International: Genetics**, v. 18, p. 131–139, 2015.

KASASHIMA, K.; NAGAO, Y.; ENDO, H. Dynamic regulation of mitochondrial genome maintenance in germ cells. **Reproductive Medicine and Biology**, v. 13, n. 1, p. 11–20, 2014.

KLOSS-BRANDSTÄTTER, A. *et al.* HaploGrep: A Fast and Reliable Algorithm for Automatic Classification of Mitochondrial DNA Haplogroups. **Human Mutation**, v. 32, n. 1, p. 25–32, 2011.

KOGELNIK, A. M. *et al.* MITOMAP: a human mitochondrial genome database. **Nucleic Acid Research**, v. 24, n. 1, p. 177–179, 1996.

KORNIENKO, I. V. *et al.* [The evaluation of stability of blood stains immobilized on the FHA cards during their prolonged storage], **Sudebno-meditsinskaia ekspertiza**, v. 57, p. 28–30, 2014.

LEWIN, B. *Genes IX*, tradução: Andréa Queiroz Maranhão *et al.* 9. ed, Porto Alegre: Artmed, 2009.

LIANG, M.; NIELSEN, R. Q&A: Who is *H. sapiens* really, and how do we know? **BMC Biology**, v. 9, n. 20, p. 1–4, 2011.

LINS, T. C. *et al.* Genetic Composition of Brazilian Population Samples Based on a Set of Twenty Eight Ancestry Informative SNPs. **American Journal Of Human Biology**, v. 22, p. 187–192, 2010.

LOCKARD, C. A. *Societies, Networks, and Transitions Volume I: To 1500: A Global History*, 3. ed., Cengage Learning, 2014.

MARRERO, A. R. *et al.* Pre- and post-Columbian gene and cultural continuity: The case of the Gaucho from southern Brazil. **Human Heredity**, v. 64, n. 3, p. 160–171, 2007.

MELTON, T. Mitochondrial DNA heteroplasmy. **Forensic Science Review**, v. 6, n. 1, p. 1–20, 2004.

MENDES-JUNIOR, C. T.; SIMOES, A. L. Mitochondrial DNA Variability among Six South American Amerindian Villages from the Pano Linguistic Group. **Human Biology**, v. 86, n. 2, p. 93–104, 2014.

MIKKELSEN, M. *et al.* Massively parallel pyrosequencing of the mitochondrial genome with the 454 methodology in forensic genetics. **Forensic Science International: Genetics**, v. 12, p. 30–37, 2014.

NAUE, J. *et al.* Evidence for frequent and tissue-specific sequence heteroplasmy in human mitochondrial DNA. **Mitochondrion**, v. 20, n. 1, p. 82–94, 2015.

NICHOLLS, T. J.; MINCZUK, M. In D-loop: 40 years of mitochondrial 7S DNA. **Experimental Gerontology**, v. 56, p. 175–181, 2014.

NOGUEIRA, T. L. S. *Estratégia do armazenamento de material genético (DNA) de militares do exército brasileiro*. 2009. 46 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Conhecimentos Militares) - Escola de Aperfeiçoamento de Oficiais, Diretoria de Educação Superior Militar, Exército Brasileiro, Rio de Janeiro, 2009.

OLIVO, P. D. *et al.* Nucleotide sequence evidence for rapid genotypic shifts in the bovine mitochondrial DNA D-loop. **Nature**, v. 306, p. 400–402, 1983.

O'ROURKE, D. H.; RAFF, J. A. The human genetic history of the Americas: review of the final frontier. **Current Biology**, v. 20, n. 4, p. R202–R207, 2010.

PALENCIA, L. *et al.* Mitochondrial DNA diversity in a population from Santa Catarina (Brazil): Predominance of the European input. **International Journal of Legal Medicine**, v. 124, n. 4, p. 331–336, 2010.

PARSON, W. *et al.* Population data for 101 Austrian Caucasian mitochondrial DNA d-loop sequences: Application of mtDNA sequence analysis to a forensic case. **International Journal of Legal Medicine**, v. 111, p. 124–132, 1998.

PARSON, W.; DÜR, A. EMPOP-A forensic mtDNA database. **Forensic Science International: Genetics**, v. 1, n. 2, p. 88–92, 2007.

PARSON, W. *et al.* DNA Commission of the International Society for Forensic Genetics: Revised and extended guidelines for mitochondrial DNA typing. **Forensic Science International: Genetics**, v. 13, p. 134–142, 2014.

PENA, S. D. J. *et al.* The Genomic Ancestry of Individuals from Different Geographical Regions of Brazil Is More Uniform Than Expected. **PLoS ONE**, v. 6, n. 2, p. e17063, 2011.

PEREGO, U. A. *et al.* The initial peopling of the Americas: A growing number of founding mitochondrial genomes from Beringia. **Genome Research**, v. 20, p. 1174–1179, 2010.

PRIETO, L. *et al.* The GHEP-EMPOP collaboration on mtDNA population data - A new resource for forensic casework. **Forensic Science International: Genetics**, v. 5, n. 2, p. 146–151, 2011.

RAMALLO, V. *et al.* Demographic Expansions in South America: Enlightening a Complex Scenario With Genetic and Linguistic Data. **American Journal of Physical Anthropology**, v. 150, n. 3, p. 453–463, 2013.

RAMOS, A. *et al.* Frequency and Pattern of Heteroplasmy in the Complete Human Mitochondrial Genome. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, p. 19–21, 2013.

RITO, T. *et al.* The first modern human dispersals across Africa. **PLoS ONE**, v. 8, n. 11, p. 1–16, 2013.

ROSA, A.; BREHM, A. African human mtDNA phylogeography at-a-glance. **Journal of Anthropological Sciences**, v. 89, p. 25–58, 2011.

SALAS, A. *et al.* The Making of the African mtDNA Landscape. **American Journal of Human Genetics**, v. 71, p. 1082–1111, 2002.

SALAS, A. *et al.* The African Diaspora: Mitochondrial DNA and the Atlantic Slave Trade. **American Journal of Human Genetics**, v. 74, p. 454–465, 2004.

SALAS, A. *et al.* Phylogeographic investigations: The role of trees in forensic genetics. **Forensic Science International**, v. 168, n. 1, p. 1–13, 2007.

SALLES, V. *O negro no Pará: sob o regime da escravidão*. 1. ed: Rio de Janeiro: Fundação Getúlio Vargas, Universidade Federal do Pará, 1971.

SANCHES, N. M. *et al.* Mitochondrial DNA control region diversity in a population from Espírito Santo state, Brazil. **Molecular Biology Reports**, v. 41, p. 6645–6648, 2014.

SCHAAN, A. P. *et al.*, mtDNA structure: the women who formed the Brazilian Northeast. **BMC Evolutionary Biology**, v. 17, n. 185, p. 1–12, 2017.

SCHWARTZ, S. B. *Segredos internos: engenhos e escravos na sociedade colonial, 1550-1835*, tradução: Laura Teixeira Motta – São Paulo: Companhia das Letras, 1988.

SCIENTIFIC WORKING GROUP ON DNA ANALYSIS METHODS, Interpretation Guidelines for Mitochondrial DNA Analysis by Forensic DNA Testing Laboratories, p. 1–23, 2013.

SILVA, M. *et al.* 60,000 years of interactions between Central and Eastern Africa documented by major African mitochondrial haplogroup L2. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1256, p. 1–13, 2015.

SILVA JR., W. A. *et al.* Mitochondrial genome diversity of native americans supports a single early entry of founder populations into America. **American Journal of Human Genetics**, v. 71, p. 187–192, 2002.

SIMÃO, F. *et al.* Defining mtDNA origins and population stratification in Rio de Janeiro. **Forensic Science International: Genetics**, v. 34, p. 97–104, 2018.

SIMONTI, C. N. *et al.* The phenotypic legacy of admixture between modern humans and Neandertals. **Science**, v. 351, n. 6274, p. 737–741, 2016.

STANGEGAARD, M. *et al.* Repeated extraction of DNA from FTA cards. **Forensic Science International: Genetics Supplement Series**, v. 3, p. e345–e346, 2011.

STEWART, J. B.; CHINNERY, P. F. The dynamics of mitochondrial DNA heteroplasmy: Implications for human health and disease. **Nature Reviews Genetics**, v. 16, n. 9, p. 530–542, 2015.

SUN, X.; ST. JOHN, J. C. The role of the mtDNA set point in differentiation, development and tumorigenesis. **Biochemical Journal**, v. 473, n. 19, p. 2955–2971, 2016.

SUTOVSKY, P. Ubiquitin-Dependent Proteolysis in Mammalian Spermatogenesis, Fertilization, and Sperm Quality Control: Killing Three Birds With One Stone. **Microscopy Research and Technique**, v. 61; p. 88–102, 2003.

TAANMAN, J.; STREET, R. H.; NW, L. The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1410, p. 103–123, 1999.

TAMM, E. *et al.* Beringian Standstill and Spread of Native American Founders. **PLoS ONE**, v. 2, n. 9, p. e229, 2007.

TAYLOR, R. W.; TURNBULL, D. M. Mitochondrial DNA mutations in human disease. **Nature Reviews Genetics**, v. 6, p. 389–402, 2005.

TORRONI, A. *et al.* Asian affinities and continental radiation of the four founding Native American mtDNAs. **American journal of human genetics**, v. 53, n. 3, p. 563–90, 1993.

TORRONI, A. *et al.* Harvesting the fruit of the human mtDNA tree. **Trends in Genetics**, v. 22, n. 6, p. 339–345, 2006.

UPHOLT, W. B; DAWID, I. B. Mapping of Mitochondrial DNA of Individual Sheep and Goats: Rapid Evolution in the D Loop Region. **Cell**, v. 11, p. 571–583, 1977.

VAN OVEN, M.; KAYSER, M. Updated comprehensive phylogenetic tree of global human mitochondrial DNA variation. **Human mutation**, v. 30, n. 2, p. 386–394, 2008.

VAN OVEN, M. PhyloTree Build 17: Growing the human mitochondrial DNA tree. **Forensic Science International: Genetics Supplement Series**, v. 5, p. e392–e394, 2015.

VEERAMAH, K. R.; HAMMER, M. F. The impact of whole-genome sequencing on the reconstruction of human population history. **Nature Reviews Genetics**, v. 15, n. 3, p. 149–162, 2014.

VERÍSSIMO, J. As populações indígenas e mestiças da Amazonia. **Revista Trimensal do Instituto Historico e Geographico Brasileiro**, Tomo L, Parte Primeira, p. 295–390, 1887.

VIGILANT, L. *et al.* African populations and the evolution of human mitochondrial DNA. **Science**, v. 253, 1503–1507, 1991.

VON WURMB-SCHWARK, N. *et al.* The impact of DNA contamination of bone samples in forensic case analysis and anthropological research. **Legal Medicine**, v. 10, n. 3, p. 125–130, 2008.

WAI, T.; TEOLI, D.; SHOUBRIDGE, E. A. The mitochondrial DNA genetic bottleneck results from replication of a subpopulation of genomes. **Nature Genetics**, v. 40, n. 12, p. 1484–1488, 2008.

WALSH, P. S.; METZGER, D. A.; HIGUCHI, R. Chelex 100 as a medium for simple extraction DNA for PCR-based typing from forensic material. **BioTechniques**, v. 10, n. 4, p. 506–513, 1991.

WILSON, I. J. *et al.* Mitochondrial DNA sequence characteristics modulate the size of the genetic bottleneck. **Human Molecular Genetics**, v. 25, n. 5, p. 1031–1041, 2016.

WURMB-SCHWARK, N. *et al.* The impact of DNA contamination of bone samples in forensic case analysis and anthropological research. **Legal Medicine**, v. 10, p. 125–130, 2008.

YUSOFF, A. A. M. *et al.* Understanding Mitochondrial DNA in Brain Tumorigenesis. **Molecular Considerations and Evolving Surgical Management Issues in the Treatment of Patients with a Brain Tumor**, p. 3–28, 2015.

APÊNDICE A_ Região controle do DNAm

Os resultados da metodologia de amplificação da região controle do DNAm por PCR direta, especialmente desenvolvida para amostras de sangue em papel de filtro armazenadas no Repositório de Amostras do Exército Brasileiro, utilizadas no presente trabalho, foram divulgados sob a forma de pôster no congresso internacional *26th Congress of the International Society for Forensic Genetics*, em setembro de 2015, na cidade da Cracóvia, Polônia e, posteriormente, publicados em formato de artigo na revista *Forensic Science International: Genetics Supplement Serie*, com o título “Mitochondrial DNA direct PCR sequencing of blood FTA paper” (APÊNDICE B).

No ano de 2016, os resultados obtidos no Estado do Mato Grosso do Sul foram apresentados como pôster no XVI Congresso Latinoamericano de Genética, da Associação Latinoamericana de Genética (ALAG), na cidade de Montevideu, Uruguai.

Em setembro de 2016, os resultados preliminares obtidos do sequenciamento da região controle do DNAm de indivíduos nascidos no Centro-Oeste do Brasil foram divulgados na forma de pôster no *27th International Symposium on Human Identification – ISHI*, na cidade de Minneapolis, Minnesota – EUA. Em outubro de 2017, os dados gerados a partir de indivíduos provenientes da região Nordeste do Brasil foram apresentados também na forma de pôster no *28th International Symposium on Human Identification – ISHI*, na cidade de Seattle, Washington – EUA.

Por fim, os resultados obtidos com a análise da região controle do DNAm de indivíduos nascidos na região Norte do Brasil foram apresentados no *27th Congress of the International Society for Forensic Genetics*, em setembro de 2017, na cidade de Seul, na Coreia do Sul e, publicados na revista *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, com o título “*MTDNA control region analysis of North Brazilian population*” (APÊNDICE C).

Todas as sequências geradas neste estudo estão sob revisão para submissão à base de dados de DNAm EMPOP e posterior submissão à revista *Forensic Science International: Genetics*.

APÊNDICE B - Mitochondrial DNA direct PCR sequencing of blood FTA paper (artigo publicado)

Forensic Science International: Genetics Supplement Series 5 (2015) e611–e613



Contents lists available at ScienceDirect

Forensic Science International: Genetics Supplement Series

Journal homepage: www.elsevier.com/locate/FSIGSS



Mitochondrial DNA direct PCR sequencing of blood FTA paper



T.L.S. Nogueira^{a,b}, T.P. Oliveira^{a,b}, E.B.V. Braz^a, O.C.L. Santos^a, D.A. Silva^{b,*}, C.R.L. Amaral^b, E.F. Carvalho^b

^a Instituto de Biologia do Exército, Rio de Janeiro, Brazil

^b Laboratório de Diagnósticos por DNA, IBRAC, State University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Available online 9 October 2015

Keywords:
Direct PCR
mtDNA
Control region
FTA paper
Dried blood spot

ABSTRACT

The use of direct PCR methods had been highly explored in forensics mainly due to reduced costs and also the reduced time spent on the analysis. In addition, as the use of washed FTA paper does not allow the quantification of DNA, the consequent increasing of PCR sensitivity makes this methodology more advantageous than the conventional extraction methods. In this study, we successfully sequenced the mitochondrial DNA control region from blood FTA samples with the elimination of the extraction step. The samples varied from one to eight years of storage and were assembled according to Anderson's reference sequence. The direct sequencing from dried blood FTA samples could be appropriate for the analysis of a large number of samples in a short time period, reducing the hands on time and also the manipulation bias.

© 2015 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

In the last years many studies have focused on the optimization of methods for sample collection, storage, and sequencing as a whole [1]. The direct PCR amplification could be a powerful alternative to analyze a large number of samples, especially in reference laboratories [2,3]. This process is gaining more and more attention within the forensic community not only by the reduced costs since some steps such as extraction, purification and quantification of DNA can be eliminated, but also by preventing the action of degrading agents during these steps. The common mtDNA sequencing process includes several steps such as the DNA extraction and purification, the amplification and purification of amplified products, the sequencing reaction, and the final purification of the sequenced products. In this study we substituted the extraction step in order to reduce the hands on time and also the manipulation bias by a 30 min washing of FTA blood spots [2,3].

2. Materials and methodology

Dried blood spot of military personnel from the Brazilian Army were selected to this study. The blood samples were collected in FTA[®] paper Classic Card (Whatman). Two circles of 1.2 mm were

punched out and submitted to a washing step with 198 μ L of purification solution (1 M Tris-HCl pH 8.0, 0.5 M EDTA pH8.5, Triton X 100 and ddH₂O) and 2 μ L of proteinase K fungal (<20 U/mg), followed by 30 min of incubation at 55 °C. The PCR amplification were performed with the QIAGEN[®] Multiplex PCR Kit, according to the manufacturer instructions. The oligonucleotides L15879 (5'-AATGGGCTGTCCITGTAGT-3') and H727 (5'-AGGGTGAACCTCACTGGAACG-3') were used to amplify all the control region generating a fragment with 1417 base pairs [4]. The cycling step were carried out on the Veriti[®] 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA) under the following conditions: initial denaturation at 95 °C for 15 min, followed by 35 cycles at 94 °C for 30 s, 60 °C for 90 s, 72 °C for 60 s, and extension final at 72 °C for 10 min. The amplified products were purified using 2 μ L of the ExoSAP 2IT[®] kit (USB Corporation). The sequencing was performed using the BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit with the same primers set of the PCR reaction. The unincorporated dye terminators were removed using the DyeEx 2.0 Spin Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instruction. Capillary electrophoresis was carried out on the ABI 3500 Genetic Analyzer and the data was analyzed using the DNA Sequencing Analysis software v5.2 (Applied Biosystems, Foster City, CA).

3. Results and conclusions

All analyzed samples generated satisfactory results for both the detection of PCR products (Fig. 1) and also in the resolution of

* Corresponding author.
E-mail address: dajse.a.silva@hotmail.com (D.A. Silva).

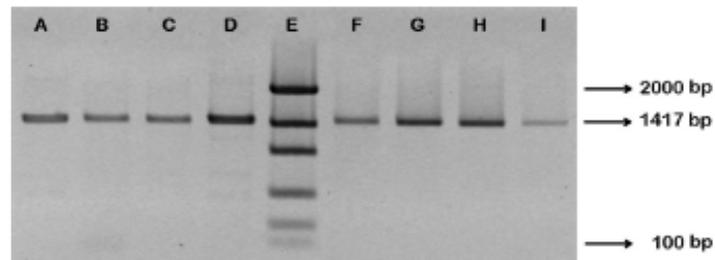


Fig. 1. Lanes A–D and F–I are PCR products with 1417 base pairs comprising the HV1, HVII, and HVII regions; Lane E is the ladder with DNA fragments of 2000, 1200, 800, 400, 200 and 100 bp.

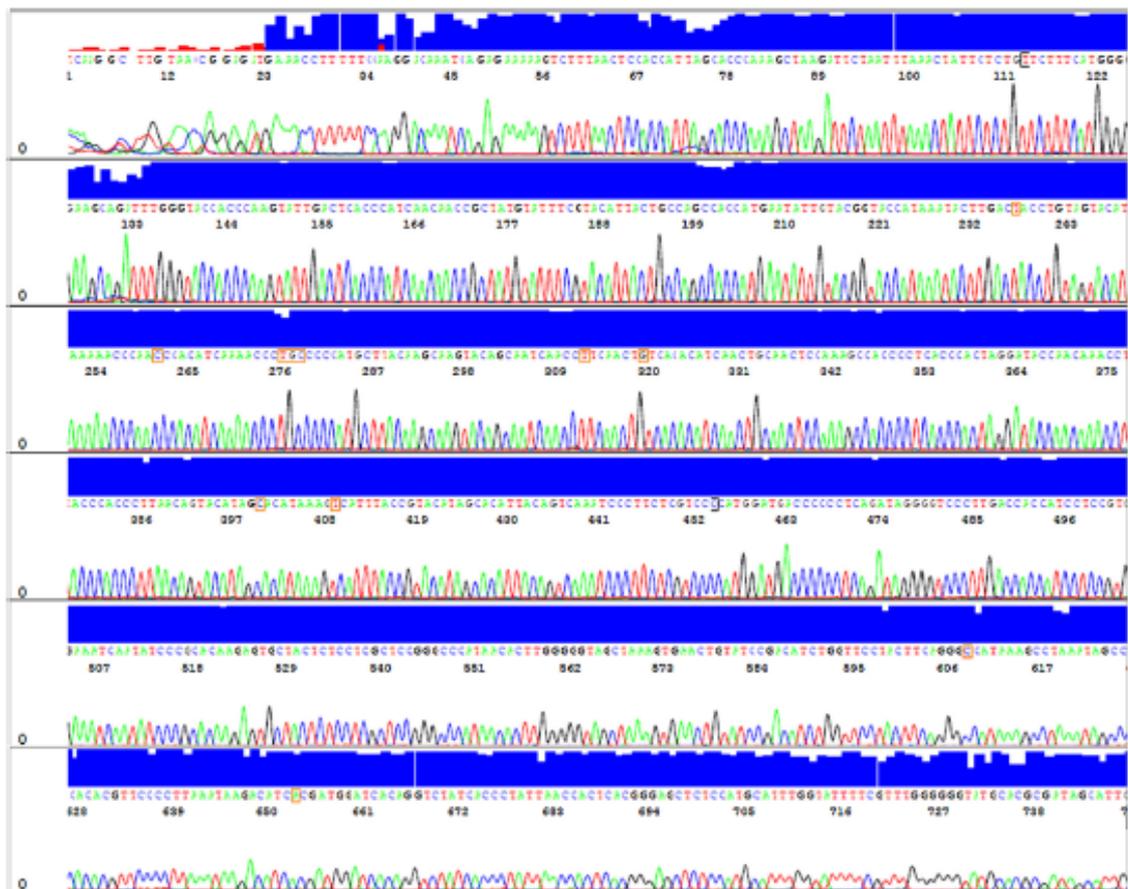


Fig. 2. Partial electropherogram of a sample from dried blood spot successfully sequenced and analyzed by Sequencing Analysis v5.4, with the HV region highlighted between 113 and 454 base pairs. The boxes mark eleven polymorphisms, two of whom are out of HV region.

peaks detected by capillary electrophoresis (Fig. 2). Several studies have been reported on different types of samples analyzed by direct amplification methods, such as buccal swabs, hairs, different animal tissues, and also forensic casework samples, suggesting that variations in the amount of PCR products were dependent on the samples quality [1,2,5], such as is the case here. Additionally, we did not find previous reports that have been used washed blood spots for direct mtDNA sequencing, in except for DNA extraction using commercial kits with silica membrane [6].

4. Conclusions

We have shown that the direct mtDNA sequencing technique can be optimized to a rapid, low-cost, and efficient method bypassing the extraction and purification steps. Samples were successfully processed generating satisfactory and reproducible results, which makes this methodology applicable for large-scale analyses, recuding the hands on time and also the manipulation bias.

Role of the funding

This study was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Conflict of interest

None.

Acknowledgments

None.

References

- [1] N.K. Grujić, S. Davidović, D. Takić, M. Mojsin, M. Stevanović, PCR Direct, Amplification of the HVSI region in mitochondrial DNA from buccal cell swabs, *Arch. Biol. Sci.* 64 (3) (2012) 851–858.
- [2] T. Kitpipit, P. Thanakiatkrai, A. Linacre, Y. Lapwong, W. Chotigeat, Low-cost direct PCR for aged and processed wildlife sample analysis, *Forensic Sci. Int. Genet. Suppl. Series 4* (2013) e71–e72.
- [3] E.L. Romsos, P.M. Vallone, Rapid PCR of STR markers: applications to human identification, *Forensic Sci. Int. Genet.* (2015) pii: S1872-4973(15)00078-2 (accessed 23.04.15).
- [4] M.M.S.G. Cardena, A. Ribeiro-dos-Santos, S. Santos, et al., Assessment of the relationship between self-declared ethnicity, mitochondrial haplogroups and genomic ancestry in Brazilian individuals, *PLoS One* 8 (2013) e62005.
- [5] R. Ottens, J. Templeton, V. Paradiso, et al., Application of direct PCR in forensic casework, *Forensic Sci. Int. Genet. Suppl. Series 4* (2013) e47–e48.
- [6] M.A. Kareem, A.J. Abdulzaha, I.H. Hameed, M.A. Jebor, A new polymorphic positions discovered in mitochondrial DNA hyper variable region HVIIII from central and north-central of Iraq, *Mitochondrial DNA* 23 (2015) 1–5.

APÊNDICE C - MTDNA CONTROL REGION ANALYSIS OF North Brazilian population (Artigo publicado)

Forensic Science International: Genetics Supplement Series 6 (2017) e169–e170



Contents lists available at ScienceDirect

Forensic Science International: Genetics Supplement Series

journal homepage: www.elsevier.com/locate/fsigss



MTDNA control region analysis of North Brazilian population

T.L.S. Nogueira^{a,b,*}, L. Alem^b, M.A. Cunha^c, P.O.M. Maciel^a, E.S.B. Valentin^a, O.C.L. Santos^a, D.A. Silva^b, E.F. Carvalho^b

^a Instituto de Biologia do Exército, Rio de Janeiro, Brazil

^b Laboratório de Diagnósticos por DNA, BRAG, State University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

^c Universidade do Grande Rio, Rio de Janeiro, Brazil



ARTICLE INFO

Keywords:

mtDNA sequencing
Direct PCR
Control region
Brazilian population

ABSTRACT

South America's demographic complexity has been historically influenced by population interactions such as the European migration and African slavery trade, besides Native Americans groups previously settled in the territory. In Brazil colonization occurred alongside different historical events at the beginning of the 16th century which intensely contributed to the genetic admixture. This study targets to enlarge on the databases with matrilineal lineages of Brazilian populations. We analyzed the mtDNA control region of blood spots from 116 individuals belonging to the North region of the country. All samples were processed by direct amplification and sequenced with fluorescent dye terminators kit by capillary electrophoresis. The haplogroups were assigned using the EMPOP online platform. Our data revealed higher rates for the Native American ancestry (57.8%), followed by African (36.2%) and European (6.0%) proportions. Considering the lack of mitochondrial lineages data further studies should be conducted in order to fully elucidate anthropological and population genetic pattern across the country.

1. Introduction

Polymorphic sites in the noncoding region of the mitochondrial DNA are useful for human population genetic studies as well as forensic investigation. Data concerning the maternal lineages from Brazilian populations are scarce and most of them have been generated just for hypervariable I and II regions (HVI and HVII). In this study, we have analyzed the mtDNA control region of 116 unrelated individuals born in North region of Brazil, which includes six out of seven States (Acre, Amazonas, Amapá, Pará, Roraima, and Tocantins).

2. Material and methods

The samples analyzed in this study are from military personnel stored at the Brazilian Army Repository of Samples. Informed consents were obtained from all volunteers. Whatman FTA blood stain cards were processed by direct amplification of 1417 base pairs fragments which were generated by flanking with the oligonucleotides L15879 (5'-AATGGGCGCTGTCTTGTAGT-3') and H727 (5'-AGGGTGAACACTCGGAACG-3') corresponding to the all mtDNA control region [3,4]. The extension products were carried out in ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) with the BigDye™ Terminator v3.1 kit. The haplogroups were classified using the online website EMPOP

ver.3 after assembly and comparison to the revised Cambridge Reference Sequence (rCRS) using the SeqScape® Software v2.5.

3. Results and discussion

The haplogroup proportion obtained for the analyzed geographical region, except the Rondônia State was Native American ancestry (57.8%), African (36.2%) and European (6.0%). In Fig. 1 are shown the proportions according to each State. The most common haplogroup was L (36.2%) and the haplogroup C (25.9%) was predominant among Native Americans (Table 1). Significant expected differences are observed when compared with the last census data of Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) in 2010, by ethnicity self-declared, which show that the North region population is composed of indigenous (37.4%), brown (12.9%), black (7.3%) and white (4.1%) people [1,2]. Maternal lineages are expected in variable proportions of African, European and Amerindian ancestry in the different Brazilian regions, due to the period of colonization, as a consequence of significant differential crosses between components of each ethnic ancestral population. Our data is in accordance with other studies that confirmed the clear influence of the historical colonization period of Brazil in the actual haplogroup proportion [1,3].

* Corresponding author at: Brazilian Army Institute of Biology, Francisco Manuel Street, 102, Benfica, Rio de Janeiro, 20911-270, Brazil.
E-mail address: tatiana.nogueira@gmail.com (T.L.S. Nogueira).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.fsigs.2017.09.065>

Received 2 September 2017; Accepted 13 September 2017

Available online 14 September 2017

1875-1768/ © 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

ETHNIC COMPOSITION - NORTH REGION OF BRAZIL

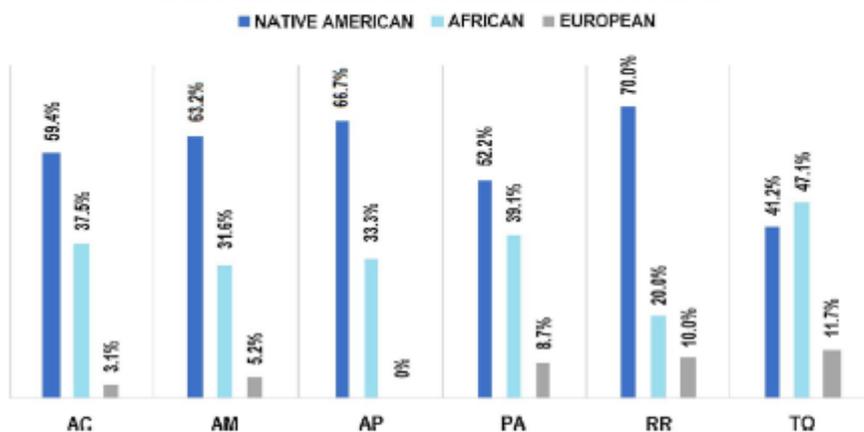


Fig. 1. Ethnic composition of North region population according to the haplogroups classification.

Table 1
Haplogroup frequencies in North region.

Haplogroups	N
A	11
B	15
C	30
D	11
H	2
HV	1
I	1
L	42
RO	1
U	1
W	1
Total	116

4. Conclusion

These data are in accordance with other data comparing the Brazilian geographical regions and reinforce the importance of further studies with applications in both the medical and forensic genetics.

Conflict of interest

None declared.

Role of funding

CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) Programa Pró-defesa 3, edital No. 031/2013.

Acknowledgments

The authors would like to thank the volunteers that donate their samples for this study.

References

- [1] S.D.J. Pena, D.G. Pietra, M. Fuchshuber-Moraes, J.P. Genro, M.H. Hutz, F.S.G. Kehdy, F. Kohrausch, L.A.V. Magno, R.C. Montenegro, M.O. Moraes, et al., The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected, *PLoS One* 6 (2) (2011) e17063.
- [2] IBGE, Atlas do Censo Demográfico 2010, IBGE, Rio de Janeiro, 2013 156p.
- [3] M.M.S.G. Castena, A. Ribeiro-dos-Santos, S. Santos, A.J. Mansur, A.C. Pereira, C. Fildman, Assessment of the relationship between self-declared ethnicity, mitochondrial haplogroups and genomic ancestry in Brazilian individuals, *PLoS One* 8 (2013) e62005.
- [4] T.L.S. Nogueira, T.P. Oliveira, E.S.V. Baz, O.C.L. Santos, D.A. Silva, C.R.L. Amaral, E.F. Carvalho, Mitochondrial DNA direct PCR sequencing of blood FTA paper, *Forensic Sci. Int. Genet. Suppl. Ser. 5* (2015) 611–613.

ANEXO A – Lista de haplótipos da região Centro-Oeste.

Amostras	Haplogrupos	n	Haplótipos
GO26	A2	2	16111T 16223T 16290T 16319A 16362C 73G 146C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C 523del 524del
DF34	A2+(64)	1	16126C 16223T 16259T 16290T 16319A 16362C 16519C 73G 146C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C 523del 524del
DF5	A2+(64)	1	16104T 16111T 16223T 16290T 16319A 16362C 16519C 64T 73G 146C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C 523del 524del 573.1C 573.2C 573.3C 573.4C
MS3	A2+(64)	1	16126C 16223T 16278T 16290T 16319A 16362C 59C 62T 64T 73G 146C 152C 153G 235G 263G 297G 315.1C 523del 524del 573.1C 573.2C 573.3C
MS31	A2+(64)	1	16111T 16223T 16290T 16319A 16362C 64T 73G 146C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C 523del 524del
MS32	A2+(64)	1	16111T 16223T 16249C 16290T 16319A 16362C 16519C 64T 73G 146C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C 523del 524del 573.1C
MS48	A2+(64)	1	16111T 16223T 16266T 16290T 16319A 16325C 16362C 64T 73G 146C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C 523del 524del
DF6	A2aa	1	16111T 16223T 16239A 16266T 16290T 16319A 16362C 64T 73G 146C 153G 207A 235G 263G 309.1C 315.1C 324T 523del 524del
GO21	A2ac	1	16111T 16213A 16223T 16290T 16319A 16362C 16519C 64T 70A 73G 146C 153G 235G 263G 315.1C 485C 523del 524del
DF1	A2ah	2	16097C 16098G 16111T 16189C 16223T 16290T 16319A 16320T 16362C 73G 146C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C 523del 524del
DF3	A2ah	1	16097C 16098G 16111T 16124C 16223T 16290T 16311C 16319A 16320T 16362C 73G 146C 153G 162T 235G 263G 309.1C 315.1C 523del 524del
MT38	A2ah	1	16097C 16098G 16111T 16223T 16290T 16319A 16362C 64T 73G 146C 153G 235G 263G 315.1C 512T 523del 524del
MS23	A2ai	1	16213A 16223T 16271C 16290T 16319A 16362C 64T 73G 146C 153G 155C 235G 263G 315.1C 523del 524del
DF21	B2	1	16182C 16183C 16189C 16217C 16241G 16519C 73G 103A 152C 263G 309.1C 309.2C 315.1C 499A
MT19	B2	1	16182C 16183C 16189C 16217C 16235G 16519C 73G 146C 151T 263G 309.1C 309.2C 315.1C 499A
DF15	B2b+152	1	16182C 16183C 16189C 16217C 16311C 16519C 73G 152C 263G 309.1C 315.1C 499A
DF16	B2b+152	1	16182C 16183C 16189C 16217C 16241G 16519C 73G 103A 152C 263G 315.1C 499A
DF50	B2b+152	1	16182C 16183C 16189C 16217C 16241G 16274A 16519C 73G 103A 152C 263G 309.1C 309.2C 315.1C 499A
MT30	B2b+152	1	16182C 16183C 16189C 16217C 16235G 16311C 16519C 73G 152C 263G 309.1C 315.1C 499A 573.1C
MT33	B2b+152	1	16093C 16182M 16183C 16189C 16217C 16356C 16519C 73G 93G 195C 263G 309.1C 309.2C 315.1C 499A
DF10	B2b3a	1	16182C 16183C 16189C 16217C 16249C 16312G 16344T 16519C 73G 152C 263G 271T 315.1C 499A
DF29	B4b	1	16183C 16189C 16217C 16327T 16519C 73G 263G 315.1C 499A 524.1A 524.2C 524.3A 524.4C
DF38	B4b	1	16183C 16188T 16189C 16217C 16519C 73G 263G 315.1C 499A
GO1	B4b	4	16178C 16183C 16189C 16217C 16519C 73G 263G 315.1C 499A
GO14	B4b	1	16182C 16183C 16189C 16217C 16316G 73G 151T 153G 260A 263G 309.1C 309.2C 315.1C 499A 523del 524del
GO27	B4b	1	16182C 16183C 16186T 16189C 16217C 16519C 73G 263G 309.1C 315.1C 499A
MS2	B4b	2	16183C 16189C 16217C 16519C 73G 263G 309.1C 315.1C 499A
MS43	B4b	1	16183C 16189C 16217C 16519C 73G 263G 309.1C 309.2C 315.1C 499A
MS46	B4b	1	16178C 16183C 16189C 16217C 16519C 73G 183G 263G 309.1C 315.1C 499A
MT23	B4b	1	16129A 16178C 16183C 16189C 16217C 16519C 73G 263G 309.1C 315.1C 499A
MT39	B4b	1	16178C 16183C 16189C 16217C 73G 263G 309.1C 315.1C 499A
DF25	C1	1	16223T 16298C 16325C 16327T 73G 207A 249del 263G 290del 291del 309.1C 315.1C 489C
DF32	C1	1	16223T 16298C 16319A 16325C 16327T 16533C 16535A 16537T 73G 249del 263G 290del 291del 315.1C 489C
MS14	C1	1	16048A 16145A 16169T 16223T 16298C 16325C 16327T 16519C 73G 249del 263G 290del 291del 309.1C 315.1C 489C
MS20	C1	2	16223T 16298C 16325C 16327T 16440C 16526A 73G 152C 249del 263G 290del 291del 309.1C 315.1C 489C 493G 523del 524del
MS38	C1	1	16172C 16298C 16325C 16327T 16526A 73G 153G 249del 263G 290del 291del 315.1C 489C 493G 523del 524del
MS45	C1	1	16189C 16223T 16298C 16325C 16327T 16519C 249del 263G 290del 291del 315.1C 489C
GO47	C1a	1	16223T 16224C 16298C 16311C 16325C 16327T 16356C 16519C 73G 249del 263G 290del 291del 315.1C 489C
GO8	C1a	1	16166G 16223T 16224C 16260T 16298C 16325C 16327T 16356C 16519C 73G 193G 249del 263G 290del 291del 315.1C 489C
DF22	C1b	1	16026A 16188.1C 16223T 16248A 16298C 16325C 16327T 16360T 73G 152C 249del 263G 290del 291del 309.1C 315.1C 489C 493G 523del 524del
DF27	C1b	1	16223T 16325C 16327T 45G 73G 113T 249del 263G 290del 291del 309.1C 315.1C 489C 493G 523del 524del
DF9	C1b	1	16145A 16223T 16325C 16327T 16545C 73G 228A 249del 263G 290del 291del 315.1C 489C 493G 523del 524del
GO2	C1b	1	16223T 16248T 16298C 16325C 16327T 56T 57C 73G 249del 263G 290del 291del 309.1C 315.1C 489C 493G 523del 524del
GO6	C1b	2	16223T 16298C 16325C 16327T 73G 249del 263G 290del 291del 309.1C 315.1C 489C 493G 523del 524del
MS15	C1b	1	16223T 16298C 16325C 16327T 16519C 73G 249del 263G 290del 291del 309.1C 315.1C 489C 493G 523del 524del
MS26	C1b	1	16189C 16190T 16193.1C 16223T 16248A 16298C 16325C 16327T 16360T 73G 152C 249del 263G 290del 291del 309.1C 315.1C 489C 493G 523del 524del
MT11	C1b	1	16192T 16223T 16298C 16325C 16327T 16356C 73G 249del 263G 290del 291del 309.1C 315.1C 489C 493G 523del 524del
MT12	C1b	1	16192T 16223T 16298C 16325C 16327T 16356C 73G 249del 263G 290del 291del 309.1C 309.2C 315.1C 489C 493G 523del 524del
MT13	C1b	1	16223T 16325C 16327T 73G 214G 249del 263G 290del 291del 315.1C 489C 493G

ANEXO B – Lista de haplótipos da região Norte.

Amostras	Haplogrupos	n	Hplótipos
AC35	A2	1	16111T 16223T 16266T 16290T 16319A 16362C 73G 146C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C 356.1C 499A 523del 524del
AM8	A2	1	16111T 16126C 16223T 16259T 16290T 16319A 16362C 16519C 73G 146C 153G 235G 263G 315.1C 523del 524del
AC36	A2+(64)	1	16104T 16111T 16223T 16290T 16319A 16362C 16519C 64T 73G 146C 153G 235G 263G 309.1C 309.2C 315.1C 523del 524del 573.1C 573.2C 573.3C 573.4C 573.5C 573.6C
AM27	A2+(64)	1	16126C 16223T 16278T 16290T 16319A 16362C 59C 62T 64T 73G 146C 152C 153G 235G 263G 297G 315.1C 523del 524del
AP1	A2+(64)	1	16126C 16223T 16278T 16290T 16319A 16362C 59C 64T 73G 146C 152C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C 523del 524del 573.1C
RR6	A2+(64)	1	16111T 16223T 16290T 16319A 16362C 16468C 16519C 64T 73G 146C 153G 185A 235G 263G 309.1C 315.1C 523del 524del
RR7	A2+(64)	1	16092C 16111T 16223T 16290T 16319A 16362C 16468C 16519C 64T 73G 146C 153G 185A 235G 263G 309.1C 315.1C 338T 523del 524del 573.1C 573.2C 573.3C 573.4C 573.5C
TO2	A2+(64)	1	16104T 16111T 16223T 16290T 16319A 16362C 16519C 64T 73G 146C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C 523del 524del 573.1C 573.2C 573.3C 573.4C 573.5C 573.6C
AC3	A2+(64)	1	16111T 16223T 16290T 16319A 16362C 64T 73G 146C 153G 235G 263G 315.1C 523del 524del
AP20	A2+(64)	1	16111T 16223T 16290T 16319A 16362C 64T 73G 146C 153G 235G 263G 309.1C 309.2C 315.1C 523del 524del
AC7	A2+(64)+@153	1	16111T 16223T 16242T 16290T 16319A 16362C 64T 73G 235G 263G 309.1C 315.1C 523del 524del
PA18	A2+(64)+@153	1	16092C 16111T 16185T 16223T 16290T 16319A 16362C 59C 64T 73G 146C 235G 263G 309.1C 315.1C 523del 524del
PA29	A2+(64)+@153	1	16111T 16192T 16223T 16259T 16290T 16319A 16362C 64T 73G 146C 235G 263G 309.1C 309.2C 315.1C 523del 524del
PA8	A2+(64)+@153	1	16111T 16223T 16352C 16362C 73G 146C 235G 263G 309.1C 315.1C 523del 524del
AP8	A2+(64)+@153	1	16111T 16223T 16290T 16319A 16362C 64T 73G 146C 235G 263G 309.1C 315.1C 523del 524del
PA3	A2+(64)+@16111	1	16148T 16223T 16290T 16319A 16362C 73G 146C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C 523del 524del 573.1C
AC47	A2+(64)+16189	1	16111T 16183C 16189C 16209C 16290T 16319A 16362C 64T 73G 146C 152C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C 523del 524del
AM18	A2+(64)+16189	1	16111T 16189C 16212G 16223T 16290T 16319A 16362C 64T 73G 146C 153G 235G 263G 309.1C 309.2C 315.1C 523del 524del
AP12	A2+(64)+16189	1	16129A 16153A 16183C 16189C 16223T 16290T 16319A 16325C 16362C 16456A 16519C 64T 73G 146C 153G 214G 235G 263G 309.1C 315.1C 523del 524del
PA15	A2+(64)+16189	1	16111T 16189C 16223T 16290T 16319A 16362C 16468C 16519C 64T 73G 146C 153G 185A 235G 263G 309.1C 315.1C 338T 523del 524del
TO34	B2	1	16183C 16189C 16217C 16362C 16519C 73G 146C 152C 263G 309.1C 309.2C 315.1C 499A
TO5	B2	1	16183C 16189C 16217C 16519C 73G 146C 152C 263G 315.1C 499A
AC45	B2b+152	1	16183C 16189C 16217C 16241G 16519C 73G 103A 152C 263G 309.1C 309.2C 315.1C 499A 500T
AM21	B2b+152	1	16183C 16189C 16217C 16519C 97A 105del 106del 107del 108del 109del 110del 152C 227G 263G 309.1C 309.2C 315.1C 499A
AC16	B2b3a	2	16182C 16183C 16189C 16217C 16249C 16312G 16344T 16519C 73G 152C 263G 271T 309.1C 309.2C 315.1C 499A
AM20	B2b3a	1	16182C 16183C 16189C 16217C 16249C 16312G 16344T 16519C 73G 152C 263G 271T 309.1C 315.1C 499A
PA4	B2b3a	1	16168T 16182C 16183C 16189C 16217C 16249C 16312G 16519C 9A 73G 152C 263G 271T 309.1C 309.2C 315.1C 499A
RR8	B2b3a	1	16092C 16182C 16183C 16189C 16217C 16249C 16312G 16344T 16519C 10C 73G 152C 263G 271T 309.1C 309.2C 315.1C 460C 463.1C 499A
AM29	B2o	1	16092C 16182C 16183C 16189C 16217C 16519C 72C 73G 214G 263G 309.1C 309.2C 315.1C 499A
AM4	B2o	1	16051G 16092C 16182C 16183C 16189C 16217C 16519C 73G 146C 263G 309del 315.1C 499A
AC40	B2o1a	3	16092C 16145A 16183C 16189C 16194C 16217C 16519C 73G 152C 263G 309.1C 309.2C 315.1C 499A
AC17	B4b	1	16183C 16189C 16217C 16519C 73G 263G 315.1C 499A 506T 524.1A 524.2C
AC24	B4b	1	16183C 16189C 16217C 16261Y 16519C 73G 263G 315.1C 499A 524.1A 524.2C 524.3A 524.4C
AC27	B4b	1	16178C 16182M 16183C 16189C 16217C 16519C 73G 263G 315.1C 499A
RR4	B4b	1	16178C 16182C 16183C 16189C 16217C 16519C 73G 263G 315.1C 499A
AC4	B4b	1	16183C 16189C 16217C 16519C 73G 263G 309.1C 309.2C 315.1C 499A 524.1A 524.2C 524.3A 524.4C
AM12	B4b	1	16183C 16189C 16217C 16519C 73G 263G 315.1C 499A 524.1A 524.2C
AM36	B4b	1	16183C 16187T 16189C 16217C 16311C 16519C 73G 263G 315.1C 499A 524.1A 524.2C
AP21	B4b	1	16093C 16182C 16183C 16189C 16217C 16362C 16519C 73G 263G 309.1C 315.1C 499A 524.1A 524.2C 524.3A 524.4C
AP24	B4b	1	16183C 16189C 16217C 16519C 73G 263G 309.1C 309.2C 315.1C 499A 524.1A 524.2C
PA25	B4b	1	16126C 16183C 16189C 16217C 16232A 16372C 16519C 73G 263G 315.1C 499A
PA35	B4b	1	16178C 16183C 16189C 16217C 16519C 73G 263G 315.1C 499A
TO8	B4b	1	16173T 16182C 16183C 16189C 16217C 16223T 16357C 16519C 73G 263G 309.1C 309.2C 315.1C 499A
AM28	C	1	16126C 16223T 16270T 16298C 16325C 16327T 73G 183G 263G 309.1C 315.1C 489C 493G 523del 524del
AC31	C1	1	16209C 16223T 16234T 16298C 16325C 16327T 16526A 44.1C 73G 188G 215G 249del 263G 290del 291del 309.1C 309.2C 315.1C 489C 493G
PA24	C1	1	16223T 16298C 16325C 16327T 16526A 73G 152C 249del 263G 290del 291del 309.1C 309.2C 315.1C 489C 493G 523del 524del
RR1	C1	1	16298C 16325C 16327T 73G 249del 263G 290del 291del 315.1C 489C 523del 524del
TO13	C1	1	16223T 16298C 16325C 16327T 16440C 16526A 73G 152C 249del 263G 290del 291del 309.1C 315.1C 489C 493G 523del 524del
AC33	C1b	3	16126C 16223T 16298C 16325C 16327T 73G 249del 263G 290del 291del 309.1C 315.1C 489C 493G 523del 524del

AC49	C1b	1	16126C	16172C	16223T	16270T	16290A	16298C	16325C	16327T	73G	249del	263G	290del	291del	309.1C	309.2C	315.1C	489C	493G	523del	524del									
AM10	C1b	1	16178C	16223T	16298C	16325C	16327T	73G	249del	263G	290del	291del	309.1C	315.1C	316A	489C	493G	523del	524del												
AM23	C1b	1	16129A	16223T	16298C	16325C	16327T	16465T	73G	146C	215R	249del	263G	290del	291del	309.1C	315.1C	489C	493G	523del	524del										
AM25	C1b	1	16223T	16298C	16325C	16327T	73G	249del	263G	290del	291del	309.1C	315.1C	489C	493G	523del	524del														
AM26	C1b	1	16146G	16223T	16298C	16325C	16327T	73G	152C	249del	263G	290del	291del	309.1C	315.1C	489C	493G	523del	524del												
AM6	C1b	3	16223T	16292T	16298C	16325C	16327T	16362C	73G	249del	263G	290del	291del	309.1C	315.1C	489C	493G	523del	524del												
AP14	C1b	1	16223T	16325C	16327T	16519C	55.1T	60del	73G	249del	263G	290del	291del	309.1C	315.1C	373T	489C	493G	523del	524del											
AP3	C1b	1	16126C	16223T	16298C	16325C	16327T	73G	249del	263G	290del	291del	309.1C	309.2C	315.1C	489C	493G	523del	524del												
AP7	C1b	1	16051G	16223T	16298C	16325C	16327T	16519C	73G	249del	263G	290del	291del	309.1C	315.1C	489C	493G	523del	524del												
PA11	C1b	1	16223T	16325C	16327T	73G	146C	151T	195C	249del	263G	290del	291del	309.1C	309.2C	315.1C	489C	493G	523del	524del	573.1C										
PA38	C1b	1	16223T	16292T	16298C	16325C	16327T	16362C	73G	249del	263G	290del	291del	309.1C	309.2C	315.1C	489C	493G	523del	524del											
RR13	C1b	1	16126C	16223T	16258C	16298C	16325C	16327T	16518A	73G	150T	200G	204C	249del	263G	283C	285T	287.1C	309.1C	315.1C	489C	493G	523del	524del							
TO37	C1b	1	16147T	16223T	16298C	16325C	16327T	16400T	73G	152Y	249del	263G	290del	291del	315.1C	489C	493G	523del	524del												
PA20	C1b+16311	1	16223T	16298C	16311C	16325C	16327T	16519C	73G	249del	263G	290del	291del	309.1C	315.1C	408A	489C	493G	523del	524del											
TO25	C1b+16311	1	16153A	16223T	16298C	16311C	16325C	16327T	16526A	73G	249del	263G	290del	291del	309.1C	315.1C	489C	493G	523del	524del											
TO4	C1b+16311	1	16153A	16223T	16298C	16311C	16325C	16327T	16526A	73G	249del	263G	290del	291del	309.1C	315.1C	489C	493G													
PA1	C1b2	1	16172C	16223T	16298C	16325C	16327T	16519C	73G	249del	290del	291del	309.1C	315.1C	489C	493G															
TO9	C1b2	1	16154C	16223T	16298C	16325C	16327T	16519C	72C	73G	249del	290del	291del	309.1C	315.1C	489C	493G	523del	524del												
AC15	C1c+195	1	16147T	16176T	16223T	16298C	16325C	16327T	73G	152C	195C	204C	249del	263G	290del	291del	309.1C	315.1C	489C												
AM30	C1d	1	16048A	16051G	16126C	16141G	16223T	16294T	16298C	16325C	16327T	73G	249del	263G	290del	291del	309.1C	315.1C	488G	489C	523del	524del									
AM33	C1d	1	16051G	16172C	16298C	16223T	16325C	16327T	16519C	73G	249del	263G	290del	291del	309.1C	315.1C	489C	523del	524del												
AP17	C1d	1	16051G	16093C	16223T	16294T	16298C	16325C	16327T	73G	249del	263G	290del	291del	309.1C	315.1C	489C	523del	524del												
AP22	C1d	1	16051G	16223T	16294T	16298C	16325C	16327T	73G	143A	154C	249del	263G	290del	291del	309.1C	315.1C	489C	523del	524del											
PA26	C1d	1	16051G	16294T	16298C	16325C	16327T	73G	249del	263G	290del	291del	309.1C	315.1C	489C	523del	524del														
PA12	C1d+194	1	16051G	16223T	16298C	16325C	16327T	16519C	73G	194T	249del	263G	290del	291del	309.1C	315.1C	489C	523del	524del												
RR12	C1d+194	1	16051G	16298C	16325C	16327T	73G	194T	249del	263G	290del	291del	315.1C	489C	523del	524del															
TO1	C1d+194	1	16051G	16093C	16223T	16287T	16298C	16311C	16325C	16327T	16456A	73G	194T	249del	263G	290del	291del	315.1C	489C	523del	524del										
AM22	C1d1	1	16051G	16172C	16223T	16298C	16325C	16327T	73G	194T	249del	263G	290del	291del	309.1C	315.1C	489C	523del	524del												
AC25	D1	3	16223T	16325C	16362C	73G	263G	309.1C	315.1C	489C																					
AC6	D1	1	16223T	16239T	16286T	16325C	16362C	73G	210G	263G	315.1C	489C																			
AC8	D1	1	16189C	16223T	16258C	16325C	16362C	73G	151T	263G	309.1C	309.2C	315.1C	489C																	
AM2	D1	1	16223T	16325C	16362C	16380T	55.1T	57C	59C	62T	73G	263G	309.1C	315.1C	489C																
AM9	D1	1	16223T	16325C	16362C	16519C	73G	195C	263G	315.1C	489C																				
PA14	D1	1	16145A	16223T	16325C	16362C	73G	263G	315.1C	489C	573.1C	573.2C	573.3C	573.4C	573.5C	573.6C															
TO23	D1	1	16223T	16325C	16362C	73G	204A	263G	315.1C	489C	573.1C	573.2C																			
TO30	D1	1	16223T	16239T	16288C	16325C	16362C	73G	210G	228A	263G	315.1C	489C																		
RR3	D1f1	1	16142T	16179T	16223T	16295T	16305R	16325C	16362C	16497G	16519C	73G	263G	315.1C	489C	524.1A	524.2C														
PA6	D4	1	16172C	16174T	16223T	16325C	16362C	73G	151T	263G	309.1C	315.1C	489C																		
AM19	D4o	1	16126C	16223T	16278T	16290T	16319A	16362C	73G	195C	263G	315.1C	489C																		
TO20	H	1	16519C	195C	263G	309.1C	315.1C																								
AM32	H1b	1	16189C	16356C	16519C	263G	315.1C	335G																							
PA19	HVO+195	1	16153A	16239T	16298C	72C	195C	263G	309.1C	315.1C																					
TO14	I5a1b	1	16129A	16148T	16223T	16391A	16519C	73G	199C	250C	263G	315.1C	494A	573.1C	573.2C	573.3C	573.4C	573.5C	573.6C												
AM13	L0a1a2	2	16129A	16148T	16188T	16172C	16187T	16188G	16189C	16223T	16230G	16311C	16320T	16519C	93G	185A	189G	200G	236C	247A	263G	315.1C	523del	524del							
TO15	L0a1b1	1	16129A	16148T	16168T	16172C	16187T	16188G	16189C	16223T	16230G	16278T	16293G	16311C	16320T	16519C	93G	95C	185A	189G	195C	236C	247A	263G	315.1C	523del	524del				
AM35	L0a2	1	16148T	16172C	16187T	16188G	16189C	16223T	16230G	16311C	16320T	16519C	64T	93G	152C	189G	236C	247A	263G	315.1C	523del	524del									
RR11	L0a2a2	1	16148T	16172C	16187T	16188G	16189C	16223T	16230G	16311C	16320T	16519C	64T	93G	150T	152C	189G	204C	207A	236C	247A	263G	315.1C	523del	524del						
AC22	L0a2a2a	1	16148T	16172C	16187T	16188G	16189C	16223T	16230G	16311C	16320T	16519C	64T	93G	150T	152C	185A	189G	204C	207A	236C	247A	263G	309.1C	315.1C	523del	524del				
AM24	L1c1b	1	16086C	16129A	16187T	16189C	16223T	16241G	16278T	16291T	16293G	16294T	16311C	16360T	16519C	73G	151T	152C	182T	186A	189C	195C	198T	247A	263G	297G	315.1C	416A	523del	524del	
AP16	L1c1b	1	16086C	16129A	16187T	16189C	16223T	16241G	16278T	16291T	16293G	16294T	16311C	16360T	16519C	73G	151T	152C	182T	186A	189C	195C	198T	247A	263G	297G	315.1C	316A	416A	523del	524del

TO36	L1c2	1	16129A	16187T	16189C	16223T	16265C	16278T	16286G	16294T	16311C	16320T	16360T	16519C	16527T	73G	151T	152C	182T	186A	189C	195C	198T	247A	263G	297G	315.1C	523del	524del	
PA5	L1c3a	1	16129A	16183C	16189C	16215G	16223T	16278T	16294T	16311C	16360T	16368C	16519C	73G	151T	152C	182T	186A	189C	247A	263G	309.1C	315.1C	316A	523del	524del				
TO40	L1c3b	1	16129A	16163G	16187T	16189C	16223T	16278T	16293G	16294T	16311C	16360T	16519C	73G	151T	152C	182T	186A	189C	247A	263G	315.1C	523del	524del						
PA9	L2a1	1	16189C	16192T	16223T	16278T	16294T	16309G	16390A	16519C	73G	143A	146C	152C	195C	263G	309.1C	315.1C												
TO6	L2a1	1	16092C	16223T	16278T	16294T	16309G	16390A	16519C	73G	146C	152C	195C	263G	315.1C	523del	524del													
AM34	L2a1+16189+(16192)	1	16189C	16192T	16223T	16278T	16294T	16309G	16519C	73G	146C	152C	195C	263G	309.1C	309.2C	315.1C													
AM38	L2a1+16189+(16192)	1	16189C	16192T	16223T	16278T	16294T	16309G	16519C	73G	146C	152C	195C	263G	309.1C	315.1C	392C													
PA32	L2a1+16189+(16192)	1	16189C	16192T	16223T	16278T	16294T	16309G	16390A	16519C	73G	146C	152C	195C	263G	309.1C	315.1C													
PA22	L2a1a1	1	16223T	16278T	16294T	16309G	16368C	16390A	16519C	73G	146C	152C	195A	263G	309.1C	315.1C	524.1A	524.2C	524.3A	524.4C										
AC29	L2a1a2	1	16126C	16223T	16278T	16286T	16294T	16309G	16390A	16519C	73G	146C	152C	195C	263G	315.1C	455.1T													
AC34	L2a1a2	3	16223T	16278T	16286T	16294T	16309G	16390A	16519C	73G	146C	152C	195C	263G	309.1C	315.1C														
TO28	L2a1c2a	1	16193T	16213A	16223T	16239T	16278T	16294T	16309G	16390A	73G	143A	146C	152C	195C	263G	309.1C	315.1C	513A											
PA7	L2a1f3	1	16189C	16223T	16274A	16278T	16294T	16309G	16390A	16519C	73G	146C	152C	195C	198T	263G	309.1C	315.1C	523del	524del										
AP23	L2a1i	1	16114A	16189C	16192T	16223T	16278T	16294T	16362C	16390A	73G	143A	146C	152C	195C	263G	309.1C	315.1C												
PA13	L2a1l	1	16086C	16183C	16189C	16223T	16264T	16278T	16294T	16309G	16390A	16519C	73G	143A	146C	152C	195C	263G	309.1C	315.1C	534T									
PA23	L2a1l	1	16183C	16189C	16223T	16278T	16294T	16390A	16519C	73G	143A	146C	152C	195C	263G	315.1C	534T													
AM15	L2b1a	1	16114A	16129A	16213A	16223T	16278T	16355T	16362C	16390A	73G	150T	152C	182T	195C	198T	204C	263G	315.1C	418T	523del	524del								
TO27	L2b2a	1	16114A	16129A	16213A	16223T	16278T	16354T	16390A	73G	146C	150T	152C	182T	195C	198T	204C	263G	315.1C											
RR2	L2c2	1	16093C	16223T	16264T	16278T	16390A	73G	93G	146C	150T	152C	182T	195C	198T	263G	315.1C	325T	523del	524del										
AC19	L2c3	1	16223T	16278T	16390A	16519C	73G	89C	93G	146C	150T	182T	195C	198T	263G	315.1C	325T	513A	523del	524del										
AC26	L3	1	16223T	16278T	16519C	73G	263G	309.1C	315.1C	318C	372C	523del	524del																	
PA27	L3b1a1	1	16093C	16124C	16223T	16278T	16362C	16519C	73G	252C	263G	315.1C	523del	524del																
AC46	L3b1a9a	1	16051G	16223T	16240G	16278T	16318G	16362C	16519C	73G	263G	309.1C	315.1C	523del	524del															
TO10	L3b2	1	16124C	16223T	16278T	16362C	16399G	16527T	73G	263G	315.1C	523del	524del																	
AC28	L3d2b	1	16093C	16111T	16124C	16223T	16519C	73G	152C	199C	263G	315.1C	523del	524del																
AP18	L3d3a	1	16124C	16183C	16189C	16223T	16278T	16304C	73G	152C	263G	315.1C	523del	524del																
AP19	L3e1	1	16223T	16287T	16311C	16327T	73G	150T	189G	200G	263G	309.1C	315.1C	523del	524del															
AM31	L3e1a	1	16185T	16223T	16327T	16519C	73G	150T	189G	200G	263G	309.1C	315.1C																	
AP5	L3e1b2	1	16223T	16325del	16326T	73G	150T	185A	189G	263G	309.1C	315.1C																		
AC10	L3e1d	1	16176T	16223T	16327T	73G	150T	152C	189G	263G	315.1C																			
PA2	L3e2a1b1	1	16223T	16320T	16399G	16519C	73G	150T	195C	198T	263G	315.1C	499A																	
AP11	L3e2a3	1	16223T	16320T	16519C	73G	150T	152C	194T	195C	263G	309.1C	315.1C																	
AP15	L3e2b	1	16078G	16172C	16182C	16183C	16189C	16223T	16320T	16519C	73G	150T	195C	263G	309.1C	315.1C														
TO19	L3e2b+152	1	16172C	16183C	16189C	16223T	16320T	16519C	73G	150T	152C	195C	263G	309.1C	315.1C															
TO21	L3e3b2	1	16223T	16265T	16519C	16527T	73G	150T	263G	315.1C	523del	524del																		
AC1	L3f1b1a1	1	16129A	16209C	16223T	16292T	16295T	16311C	16362C	16519C	73G	189G	200G	263G	272G	315.1C														
AC20	L3f1b4	1	16192Y	16209C	16218T	16223T	16256T	16292T	16311C	16519C	73G	150T	189G	200G	263G	315.1C														
AP6	L3f1b4c	1	16209C	16218T	16223T	16256T	16291T	16292T	16311C	16519C	73G	150T	200G	263G	315.1C															
AC23	L3k1	2	16209C	16223T	16355T	73G	150T	152C	235G	263G	315.1C	494T																		
PA21	R0	1	16519C	263G	309.1C	309.2C	315.1C																							
AC2	U2e1	1	16051G	16129C	16183C	16189C	16362C	16519C	73G	152C	217C	263G	309.1C	309.2C	315.1C	340T	508G	523.1C	523.2A											
RR5	W+194	1	16223T	16292T	16318G	16519C	73G	189G	194T	195C	204C	207A	263G	309.1C	315.1C	523del	524del													

Nota: Haplótipos compartilhados: AC16=TO3, AC40=AC41=AC43, AC33=AP9=PA40, AM6=AM7=AP13, AC25=AC38=PA16, AM13=AM14, AC34=AC9=PA17, AC23=AC32.

ANEXO C – Lista de haplótipos da região Nordeste.

Amostras	Haplogrupos	n	Haplótipos
MA6	A2	1	16111T 16223T 16290T 16319A 16362C 73G 146C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C 472G 523del 524del
PI21	A2	1	16111T 16223T 16269G 16290T 16319A 16360T 16362C 73G 146C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C 485C 523del 524del
AL17	A2+(64)	1	16111T 16223T 16290T 16319A 16362C 16381C 64T 73G 146C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C 523del 524del
CE20	A2+(64)	1	16104T 16111T 16223T 16290T 16319A 16362C 16519C 64T 73G 146C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C 523del 524del 573.1C 573.2C 573.3C
MA30	A2+(64)	1	16111T 16223T 16290T 16319A 16352C 16362C 16519C 64T 73G 146C 152C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C 523del 524del
PE1	A2+(64)	1	16126C 16223T 16278T 16290T 16319A 16362C 59C 64T 73G 146C 152C 153G 235G 263G 297G 309.1C 315.1C 523del 524del 573.1C
PE12	A2+(64)	1	16104T 16111T 16223T 16290T 16319A 16362C 64T 73G 143A 146C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C 456T 523del 524del
PI13	A2+(64)	1	16111T 16290T 16311Y 16319A 16361A 16362C 64T 73G 146C 153G 235G 263G 309.1C 309.2C 315.1C 513A 523del 524del
PI3	A2+(64)	1	16126C 16223T 16278T 16290T 16319A 16362C 64T 73G 146C 152C 153G 235G 263G 297G 309.1C 309.2C 315.1C 523del 524del 573.1C
PI5	A2+(64)	1	16111T 16290T 16319A 16361A 16362C 64T 73G 146C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C 513A 523del 524del
RN10	A2+(64)	1	16126C 16223T 16278T 16290T 16319A 16362C 59C 64T 73G 146C 153G 235G 263G 297G 309.1C 315.1C 523del 524del
RN11	A2+(64)	1	16111T 16223T 16290T 16319A 16362C 64T 73G 143A 146C 152Y 153G 235G 263G 309.1C 315.1C 456T 523del 524del
PI6	A2+(64)+@153	1	16092C 16111T 16185T 16223T 16290T 16319A 16362C 59C 64T 73G 146C 235G 263G 315.1C 523del 524del
PE19	A2ab	1	16111T 16223T 16290T 16291T 16319A 16362C 64T 73G 146C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C 523del 524del
PI8	A2ab	1	16086C 16111T 16129A 16223T 16290T 16291T 16319A 16362C 57A 58G 59C 64T 73G 146C 153G 235G 236C 263G 309.1C 309.2C 315.1C 523del 524del
AL13	B2b3a	1	16182C 16183C 16189C 16217C 16249C 16312G 16344T 16381C 16519C 73G 152C 263G 271T 309.1C 309.2C 315.1C 499A
AL14	B4b	1	16182C 16183C 16186T 16189C 16217C 16311C 16519C 73G 263G 309.1C 315.1C 499A
AL2	B4b	1	16173T 16182C 16183C 16189C 16217C 16223T 16357C 16519C 73G 263G 306del 307del 308del 309del 315.1C 499A
CE9	C1	1	16223T 16265C 16298C 16325C 16327T 16519C 60.1T 60.2T 64del 73G 249del 263G 290del 291del 309.1C 315.1C 489C 523del 524del
BA8	C1a	1	16223T 16224C 16298C 16311C 16325C 16327T 16356C 16519C 73G 249del 263G 290del 291del 315.1C 489C
AL1	C1b	1	16147T 16223T 16298C 16325C 16327T 16400T 73G 249del 263G 290del 291del 309.1C 315.1C 489C 493G 523del 524del
AL4	C1b	1	16086C 16223T 16259T 16298C 16325C 16327T 16526A 73G 249del 251A 263G 290del 291del 309.1C 315.1C 489C 493G 523del 524del 573.1C 573.2C
BA26	C1b	1	16127G 16223T 16234T 16298C 16325C 16327T 73G 152C 188G 249del 263G 290del 291del 309.1C 315.1C 489C 493G 524.1A 524.2C
BA5	C1b	1	16129A 16223T 16298C 16325C 16327T 42C 73G 139C 207A 249del 263G 290del 291del 309.1C 315.1C 489C 493G 523del 524del
CE12	C1b	1	16126C 16223T 16298C 16325C 73G 249del 263G 290del 291del 309.1C 315.1C 489C 493G 523del 524del
PI24	C1b	1	16129A 16223T 16298C 16325C 16327T 42C 73G 139C 207A 249del 263G 290del 291del 309.1C 309.2C 315.1C 489C 493G 523del 524del
PI9	C1b	1	16223T 16298C 16325C 16327T 73G 146C 249del 263G 290del 291del 309.1C 315.1C 489C 493G 523del 524del
MA22	C1b2	1	16145A 16223T 16298C 16325C 16327T 16519C 73G 249del 290del 291del 309.1C 315.1C 489C 493G 523del 524del
MA24	C1b2	1	16075C 16223T 16298C 16325C 16327T 16519C 73G 249del 290del 291del 315.1C 489C 493G 523del 524del
BA20	C1b8	2	16223T 16292T 16298C 16325C 16327T 16362C 73G 249del 263G 290del 291del 309.1C 315.1C 489C 493G 523del 524del
AL18	C1d+194	2	16051G 16223T 16298C 16311C 16325C 16327T 73G 194T 249del 263G 290del 291del 309.1C 315.1C 489C 523del 524del
CE10	C1d+194	1	16051G 16184T 16223T 16287T 16298C 16311C 16325C 16327T 73G 146C 194T 249del 263G 290del 291del 309.1C 315.1C 489C 523del 524del
AL5	C1d+194	2	16051G 16223T 16298C 16325C 16327T 16519C 73G 194T 249del 263G 290del 291del 309.1C 315.1C 489C 523del 524del
PE4	C1d1+194	1	16051G 16184T 16223T 16287T 16298C 16311C 16325C 16327T 73G 146C 194T 249del 263G 290del 291del 315.1C 489C 523del 524del
RN18	C1d1+194	1	16051G 16093C 16223T 16287T 16298C 16311C 16325C 16327T 73G 194T 249del 263G 290del 291del 315.1C 489C 523del 524del
CE13	D1	1	16187A 16223T 16325C 16362C 73G 263G 309.1C 315.1C 489C
MA2	H	1	16129A 16519C 263G 309.1C 309.2C 315.1C
BA16	H2a5b1	1	16519C 152C 249del 263G 315.1C
RN21	H6a1a1a	1	16311C 16362C 16482G 239C 263G 309.1C 309.2C 315.1C
PI26	HV0	1	16298C 72C 152C 263G 295T 309.1C 315.1C
RN17	J1c1	1	16069T 16126C 16172C 73G 185A 228A 263G 295T 315.1C 462T 482C 489C
CE29	J2b1c1	1	16069T 16126C 16193T 16319A 16360T 73G 150T 152C 263G 295T 309.1C 315.1C 489C 523del 524del
AL15	K1a	1	16224C 16311C 16519C 73G 195C 263G 315.1C 497T
PE11	K1a	1	16224C 16311C 16519C 73G 195C 263G 315.1C 374G 497T 524.1A 524.2C

ANEXO D. Aprovação do CEP-HUPE/UERJ**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: DNA MITOCONDRIAL: Identificação de linhagens maternas na População Brasileira

Pesquisador: Tatiana Lúcia Santos Nogueira

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 55747516.0.0000.5259

Instituição Proponente: Hospital Universitário Pedro Ernesto/UERJ

Patrocinador Principal: MINISTERIO DA EDUCACAO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.542.187

Apresentação do Projeto:

O presente projeto se caracteriza por apresentar proposta de realização do primeiro estudo vinculado ao estudo do mtDNA no âmbito da população brasileira que se relaciona com um projeto de interesse da defesa nacional. É parte integrante do projeto intitulado "Estudos estratégicos em Defesa Nacional, Educação Nacional e Ensino Militar no Âmbito das Aplicações Forenses do DNA", aprovado no Edital CAPES/Pró-Defesa n° 031/2013, o sob a coordenação do Prof. Dr. Elizeu Fagundes de Carvalho, no âmbito de convênio entre o Instituto de Biologia do Exército e a Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Serão analisadas amostras pertencentes ao Repositório de Amostras do Exército Brasileiro, provenientes de todo território nacional, com o intuito principal de construir um Banco de dados de perfis genéticos mitocondriais especificamente de militares. O mesmo poderá também agregar informações importantes com diversas aplicações na identificação humana e de outras espécies.

Endereço: Avenida 28 de Setembro 77 - Térreo
Bairro: Vila Isabel **CEP:** 20.551-030
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)2868-8253 **Fax:** (21)2264-0853 **E-mail:** cep-hupe@uerj.br



Continuação do Parecer: 1.542.187

Biorepositório / Biobanco	TCUD_Tatiana_Nogueira.pdf	01/04/2016 11:02:29	Tatiana Lúcia Santos Nogueira	Aceito
------------------------------	---------------------------	------------------------	----------------------------------	--------

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIO DE JANEIRO, 12 de Maio de 2016

Assinado por:
DENIZAR VIANNA ARAÚJO
(Coordenador)

Endereço: Avenida 28 de Setembro 77 - Térreo
 Bairro: Vila Isabel CEP: 20.551-030
 UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
 Telefone: (21)2868-8253 Fax: (21)2264-0853 E-mail: cep-hupe@uerj.br

ANEXO E. Termo de Consentimento de Uso de Dados (TCUD).



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto de Alcântara Gomes
Laboratório de Diagnósticos por DNA



TERMO DE CONSENTIMENTO DE USO DE BANCO DE DADOS (Conselho Nacional de Saúde, Resolução 196/96)

Pesquisadores Responsáveis: Elizeu Fagundes de Carvalho (IBRAG – UERJ) – Telefone (21) 2334-2183
Dayse Aparecida da Silva (IBRAG – UERJ) – Telefone (21) 2334-2183
Tatiana Lúcia Santos Nogueira (IBEX – EB) – Telefone (21) 3860-1615

Nós, pesquisadores supra citados e abaixo assinados, envolvidos no projeto de título: DNA MITOCONDRIAL – ANÁLISE DE LINHAGENS MATERNAS NA POPULAÇÃO BRASILEIRA, referente ao projeto de tese de doutorado de Tatiana Lúcia Santos Nogueira, nos comprometemos a manter a confidencialidade sobre as amostras utilizadas e seus respectivos dados coletados nos arquivos do REPOSITÓRIO DE AMOSTRAS DO EXÉRCITO BRASILEIRO - RAEx, situado no interior das instalações do Instituto de Biologia do Exército – IBEx, bem como a privacidade de seus conteúdos, como preconizam os Documentos Internacionais e a Resolução CNS nº 196/96 do Ministério da Saúde. Informamos que os dados a serem coletados dizem respeito a naturalidade e etnia dos militares cadastrados no sistema, incluindo todos os Estados brasileiros. Declaramos ainda que:

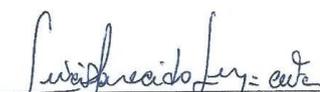
- a) O acesso aos dados, para fins da pesquisa científica, será feito somente após aprovação do projeto de pesquisa pelo CEP- HOSPITAL UNIVERSITÁRIO PEDRO ERNESTO (CEP-HUPE);
- b) O acesso aos dados será supervisionado por uma pessoa que esteja plenamente informada sobre as exigências de confiabilidade;
- c) Asseguraremos o compromisso com a privacidade e a confidencialidade dos dados utilizados, preservando integralmente o anonimato e a imagem do sujeito bem como a sua não estigmatização;
- d) Asseguraremos a não utilização das informações em prejuízo das pessoas e/ou das comunidades, inclusive em termos de autoestima, de prestígio e/ou econômico-financeiro;
- e) Os dados obtidos na pesquisa serão usados exclusivamente para a finalidade prevista no protocolo;
- f) Os dados obtidos na pesquisa somente serão utilizados para o projeto vinculado. Todo e qualquer outro uso que venha a ser planejado, será objeto de novo projeto de pesquisa, que será submetido à apreciação do CEP-HUPE;
- g) Devido à impossibilidade de obtenção do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido de todos os sujeitos, assinaremos esse Termo de Consentimento de Uso de Banco de Dados, para a salvaguarda de seus direitos.

Rio de Janeiro, RJ, 13 de outubro de 2015.


Elizeu Fagundes de Carvalho – RG 3815593 (SSP/RJ)


Dayse Aparecida da Silva – RG 21798 (CRBio-2)


Tatiana Lúcia Santos Nogueira – RG 0114772643 (MD/EB)
Pesquisador que irá acessar os dados


Lúcio Aparecido Luiz – Cel
RG 0476002134 (MD/EB)
Diretor do IBEX

ANEXO F. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).



Instituto de Biologia Roberto de Alcântara Gomes – UERJ

Instituto de Biologia do Exército – IBEx



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (Elaborado em 11/08/2014)

Título do projeto de pesquisa: “DNA mitocondrial – análise de linhagens maternas na população brasileira”

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa que irá estudar as características do DNA mitocondrial de diversos indivíduos da população brasileira, com o objetivo de construir um banco de dados representativo de todo país, entre outros. Os pesquisadores responsáveis, Dr. Elizeu Fagundes de Carvalho, Dr^a Dayse Aparecida da Silva, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, e a Major Farmacêutica Tatiana Lúcia Santos Nogueira do Instituto de Biologia do Exército, no Rio de Janeiro, pretendem realizar um estudo com as seguintes características:

Objetivo do estudo: padronizar metodologias para análise de DNA mitocondrial no âmbito do Exército Brasileiro, com o intuito de possibilitar a identificação de restos mortais de militares; e construir um banco de dados de DNA mitocondrial da população brasileira.

Benefícios aos participantes e para a sociedade: o indivíduo poderá não se beneficiar por participar deste estudo, mas estará ajudando os pesquisadores a obter informações para o estabelecimento de uma metodologia de análise molecular que será utilizada em processos de identificação de militares. Além disso, os resultados da pesquisa possibilitarão a construção de um banco de dados de DNA mitocondrial da população brasileira, o qual poderá contribuir na identificação de indivíduos também no âmbito civil.

Descrição dos procedimentos para coleta do material biológico: será realizada uma coleta de sangue com uma agulha do dedo médio de uma das mãos, de onde serão recolhidas algumas gotas do sangue em papel de filtro absorvente. Todo procedimento será realizado por equipe capacitada, utilizando material descartável. Não há risco relacionado ao procedimento da coleta do sangue do dedo, por ser um procedimento minimamente invasivo que envolve apenas uma pequena picada de agulha.

Garantia de liberdade: Sua participação é totalmente voluntária. Você pode escolher não participar ou desistir a qualquer momento. Além disso, nenhum membro da pesquisa ou mesmo

superior hierárquico o constringerá ou ordenará a participar do estudo, estando a participação subordinada à sua escolha individual.

Direito de confidencialidade e acessibilidade: Cada participante poderá ter acesso, a qualquer momento, ao seu próprio resultado. As informações relacionadas ao estudo são tratadas como confidenciais e servirão para a elaboração de literatura científica. No entanto, se qualquer informação for divulgada em relatório ou publicação, isto será feito sob a forma codificada, sem aparecer nenhum nome, para que o sigilo seja mantido.

Despesas e compensações: A sua participação no estudo não terá custo algum. As despesas porventura existentes serão de responsabilidade dos pesquisadores. Pela sua participação no estudo, você também não receberá nenhum valor ou compensação financeira.

Garantia de acesso aos pesquisadores: em qualquer fase do estudo você terá pleno acesso aos pesquisadores responsáveis:

Maj Tatiana pelo telefone (21) 3890-2135 ramal 2133; no Instituto de Biologia do Exército, situado à Rua Francisco Manuel, 102, bairro Benfica, Rio de Janeiro, RJ, ou através do e-mail: tnogueira.ibex@hotmail.com

Professora Dayse Aparecida da Silva, D.Sc. Professora Adjunta, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ. Av. São Francisco Xavier, 524 – Prédio Haroldo Lisboa da Cunha – Térreo – Laboratório de Diagnósticos por DNA. Tel: 21-2334-2183, email: dayse.a.silva@gmail.com.br.

Havendo necessidade, será possível, ainda, entrar em contato com o Comitê de Ética do Hospital Pedro Ernesto (HUPE), Boulevard 28 de setembro, 77, térreo - Vila Isabel Cep 20.551-030 - Rio de Janeiro - RJ, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, ou pelo telefone 2868-8253, de segunda-feira a sexta-feira das 09:00-12:00h e 13:00-17:00h, ou através do e-mail: cep-hupe@uerj.br.

CONSENTIMENTO

Rio de Janeiro, ___ / ___ / _____. Eu, _____ li o texto acima e compreendi a natureza e o objetivo do estudo do qual fui convidado a participar. A explicação que recebi menciona os riscos e benefícios do estudo. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação no estudo a qualquer momento sem justificar minha decisão, e sei que qualquer problema relacionado será livre de custos para mim. Eu concordo voluntariamente em participar deste estudo e receberei uma cópia desse Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e a outra ficará com o pesquisador responsável por essa pesquisa.

Assinatura do voluntário _____ Idade _____

Assinatura do pesquisador _____

